

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Análisis de la patogenicidad de la nueva variante de la enfermedad vírica
hemorrágica del conejo (RHDVb)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sonsoles Pacho Jiménez

Directora

Mónica Suárez Rodríguez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Análisis de la patogenicidad de la nueva variante de la Enfermedad Vírica
Hemorrágica del conejo (RHDVb)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sonsoles Pacho Jiménez

Bajo la dirección de la Doctora

Mónica Suárez Rodríguez

Madrid, 2017

La realización de esta investigación ha sido posible gracias a la financiación otorgada a través del *Proyecto 129/2015 de la Universidad Complutense de Madrid y Laboratorios Ovejero S.A.*, cuya investigadora principal es la Dra. Mónica Suárez Rodríguez.



D^a Mónica Suárez Rodríguez, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Análisis de la patogenicidad de la nueva variante de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del conejo (RHDVb)”, que presenta la Licenciada en Veterinaria D^a Sonsoles Pacho Jiménez, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, y estimamos que cumple todos los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 25 de julio de 2017

Fdo.: Dra. Mónica Suárez Rodríguez

*“Estaba yo un día de espera con mi padre, mucho antes de ser de día,
ahí, al abrigo, por'cima de ese morro,
cuando vimos salir un conejo debajo mismo de nuestros pies.
Traspuso como un rayo... no sabía ni dónde se había metido...
y le maté ahí un poco más abajo, en esos ramos, a la misma cama”*

(S.J.H.)

INDICE

I.a. RESUMEN	17
I.b. SUMMARY	25
II. LISTADO DE ABREVIATURAS	31
III. LISTADO DE FIGURAS	33
IV. LISTADO DE TABLAS	39
V. INTRODUCCIÓN	43
1. IMPORTANCIA DEL CONEJO EN NUESTRA SOCIEDAD	45
1.1 Evolución y taxonomía de la especie	45
1.2 Historia de la co-evolución entre el hombre y el conejo	47
1.3 El conejo silvestre	49
1.3.1 Importancia del conejo en el ecosistema Mediterráneo	49
1.3.2 Características fisiológicas y etológicas del conejo silvestre	50
1.3.3 El conejo silvestre y la actividad cinegética	51
1.4 El conejo doméstico y la actividad productiva	52
1.5 El conejo en investigación	53
1.6 El conejo de compañía	54
1.7 Conclusiones	55
2. PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL CONEJO	56
2.1 Importancia de las enfermedades infecciosas del conejo	56
2.2 Enfermedades infecciosas de origen bacteriano	57
2.2.1 Tularemia	57
2.2.2 Principales infecciones bacterianas respiratorias	58
2.2.3 Principales infecciones bacterianas digestivas	59
2.2.4 Principales infecciones bacterianas de la piel	61

2.3	Enfermedades parasitarias	61
2.3.1	Parasitosis internas	61
2.3.2	Parasitosis externas	63
2.4	Enfermedades infecciosas de origen fúngico	65
2.5	Enfermedades infecciosas de origen vírico	66
2.5.1	Mixomatosis	66
2.5.2	Enfermedad Vírica Hemorrágica del conejo	69
3.	ENFERMEDAD VÍRICA HEMORRÁGICA	69
3.1	Contexto histórico	69
3.2	Etiología	72
3.2.1	Los calicivirus	72
3.2.2	Calicivirus del conejo: variantes no patógenas y de baja patogenicidad	74
3.2.2.1	RCV	74
3.2.2.2	RCV-A1	75
3.2.2.3	MRCV	75
3.2.3	El virus del Síndrome de la Liebre Parda Europea	76
3.2.4	El virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo	77
3.2.4.1	Características morfológicas	77
3.2.4.1.1	CLP	78
3.2.4.1.2	VLP	78
3.2.4.2	Características genéticas	79
3.2.4.3	Características físico-químicas	81
3.2.4.4	Grupos genéticos descritos	82
3.3	Epidemiología	83
3.3.1	Distribución del virus	83

3.3.1.1	Situación de la Península Ibérica	83
3.3.1.2	Situación de Australia y Nueva Zelanda	85
3.3.2	Hospedadores	86
3.3.2.1	Hospedador natural	86
3.3.2.2	Hospedadores accidentales	86
3.3.2.3	Infección experimental heteróloga	87
3.3.3	Vías de transmisión	88
3.3.4	Factores implicados en la diseminación de la enfermedad	88
3.4	Patogenia	89
3.4.1	Ciclo biológico del virus	90
4.4.1.1	Ciclo celular del virus	90
4.4.1.2	Diseminación orgánica del virus	90
3.4.2	Clínica de la enfermedad	91
3.4.2.1	Signos clínicos de la enfermedad	91
3.4.2.2	Formas clínicas de la enfermedad	92
3.4.3	Órganos diana: lesiones macroscópicas e histológicas	93
3.4.3.1	Órganos diana	93
3.4.3.1.1	Hígado	93
a.	Alteraciones macroscópicas	93
b.	Alteraciones histológicas	93
3.4.3.1.2	Bazo	93
a.	Alteraciones macroscópicas	93
b.	Alteraciones histológicas	94
3.4.3.1.3	Pulmón	94
a.	Alteraciones macroscópicas	94
b.	Alteraciones histológicas	94

3.4.3.1.4 Riñón	94
a. Alteraciones macroscópicas	94
b. Alteraciones histológicas	94
3.4.3.2 Otras lesiones orgánicas	95
3.4.3.3 Alteraciones producidas por RHDVb	95
3.4.4 Diagnóstico presuntivo	96
3.4.5 Diagnóstico diferencial	96
3.4.6 Alteraciones en los parámetros fisiológicos	96
3.4.7 Mecanismos de resistencia a la enfermedad	98
3.4.7.1 Respuesta Inmune y resistencia innata a la infección	98
3.4.7.2 Papel de los HBGAs en la resistencia a la infección	100
3.5 Diagnóstico laboratorial	102
3.5.1 Métodos de detección del virus	102
3.5.2 Métodos de detección de anticuerpos específicos	103
3.6 Profilaxis sanitaria	103
3.6.1 Medidas higiosanitarias y de control	103
3.6.2 Situaciones de emergencia sanitaria	104
3.6.3 Vacunación sistemática	104
3.6.4 Tratamiento de la enfermedad	106
VI. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	107
VII. RESULTADOS	111
Capítulo 1. Evaluación de una nueva vacuna frente a la variante b del virus de la enfermedad hemorrágica en gazapos	113
1.a Resumen	113
1.b Abstract	114
2. Introducción	114

3.	Material y métodos	118
3.1	Experimentación animal	118
3.2	Preparación de la vacuna	119
3.3	Preparación de los inóculos virales	119
3.4	Procedimiento experimental	119
4.	Resultados	121
5.	Discusión	124
6.	Conclusiones	126
Capítulo 2. Análisis de la respuesta immune en gazapos frente a un aislado español de RHDVb		127
1.a	Resumen	127
1.b	Abstract	128
2.	Introducción	128
3.	Material y métodos	130
3.1	Preparación de los aislados virales	130
3.2	Experimentación animal	130
3.3	ELISA-DAS	132
3.4	Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)	132
3.5	ELISA-IFN γ	133
4.	Resultados	134
4.1	Infección experimental	134
4.2	Niveles de IFN γ	135
4.3	Niveles de anticuerpos específicos frente al RHDVb	136
5.	Discusión	137
6.	Conclusiones	140

Capítulo 3. Análisis comparativo de los hallazgos anatomopatológicos en gazapos infectados con 4 aislados de RHDVb	141
1.a Resumen	141
1.b Abstract	142
2. Introducción	142
3. Material y métodos	146
3.1 Experimentación animal	146
3.2 Preparación del inóculo viral	147
3.3 Procesado de las muestras para histología	147
4. Resultados	148
4.1 Signos clínicos	148
4.2 Lesiones macroscópicas	150
4.2.1 Órganos diana	150
4.2.2 Otros órganos	158
4.3 Hallazgos histológicos	160
4.3.1 Órganos diana	160
4.3.2 Otros órganos	162
5. Discusión	163
6. Conclusiones	166
VIII.DISCUSIÓN	167
1. Evaluación de una nueva vacuna frente al RHDVb en gazapos	169
2. Valoración de la Respuesta Inmune en gazapos frente a un aislado del RHDVb	174
3. Hallazgos anatomopatológicos en animales expuestos de forma experimental al RHDVb	178
4. Posibilidades de tratamiento de la enfermedad. Viabilidad de las	180

opciones terapéuticas actuales	
5. Importancia de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo como modelo de estudio en medicina humana	182
IX. CONCLUSIONES	185
X. BIBLIOGRAFÍA	189
XI. ANEXOS	217
1. Assessment of a novel vaccine against Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Young rabbits (<i>Viral Immunology</i>)	
2. Parasitosis digestivas más frecuentes en conejos (<i>Boletín de Cunicultura</i>)	
3. Enfermedad hemorrágica del conejo (<i>Boletín de Cunicultura</i>)	

I.a. RESUMEN

RESUMEN

La Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo es una patología de esta especie, que se describió por primera vez en el año 1984. El primer brote conocido de la enfermedad se notificó en China, causando millones de bajas en la región asiática y, posteriormente, en Europa. A pesar de las medidas de control establecidas, la enfermedad alcanzó el continente Americano, afectando a Estados Unidos, Méjico y varios países del Sur del continente. La enorme virulencia y la gran capacidad de transmisión que mostraba la enfermedad, la convirtió en una plaga temible en todo el Mundo. Sin embargo, estas mismas características que supusieron un problema a nivel mundial, fueron las idóneas para solucionar un problema aun mayor en Oceanía. Debido a la plaga de conejos existente en este continente, décadas antes se había introducido la mixomatosis con el objetivo de eliminar la población de conejos, que incrementaba su tamaño de forma incontrolada causando daños irreparables en el ecosistema local. Sin embargo, cuando este método perdió su eficacia inicial tras utilizarlo durante décadas, la idea de introducir la enfermedad hemorrágica para controlar estas poblaciones, comenzó a estudiarse.

A pesar de la controversia inicial que produjo esta propuesta, en los años 90, la enfermedad se estableció en Australia y Nueva Zelanda, diezmando las poblaciones de conejos. Sin embargo, casi dos décadas más tarde, este método de control ha perdido su impacto inicial, al igual que ocurrió con la mixomatosis, por lo que el conejo continúa siendo un problema en la zona. En el resto del Planeta, la Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo es endémica en más de 40 países, causando brotes esporádicos que producen grandes pérdidas económicas y un importante impacto medioambiental, al reducir las poblaciones de una presa clave en el ecosistema. En la Península Ibérica, el impacto de la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica ha desequilibrado gravemente un ecosistema que, al igual que en otras regiones Mediterráneas, depende en gran medida de la presencia del conejo. El bosque Mediterráneo, hábitat natural de esta especie, y los depredadores peninsulares, especialmente los que se hallan en peligro de extinción, como el lince ibérico o el águila imperial, son los más afectados por la reducción en el número de conejos silvestres que ha producido esta enfermedad.

La herramienta que permite controlar esta enfermedad es el estudio de su agente causal. Por este motivo, tras la declaración de los primeros brotes, comenzó una investigación exhaustiva sobre el origen de la enfermedad y sus características, que continúa hoy en día. El agente etiológico de la enfermedad es un virus ARN que pertenece a la Familia Caliciviridae y se encuadra en el Género Lagovirus. Este género agrupa a virus de los lagomorfos, muy específicos de especie y no cultivables *in vitro*. Esta característica resulta de especial importancia, ya que la ausencia de un medio de estudio del virus como éste, dificulta considerablemente el conocimiento del agente patógeno y sus características. Este virus se encuentra muy relacionado filogenéticamente con el resto de virus de lagomorfos. Por un lado, su cercana relación con el Virus del Síndrome de la Liebre Parda Europea, ha sido objeto de múltiples investigaciones para dilucidar si ambas enfermedades estaban producidas por el mismo agente, así como las posibilidades de causar infección cruzada, en caso de ser virus distintos. No obstante, a pesar de haberse descrito casos de RHDV en liebres, el pensamiento general hoy en día es que se trata de infecciones accidentales. En segundo lugar, el virus de la enfermedad hemorrágica se encuentra muy próximo, a nivel filogenético, al resto de lagovirus específicos del conejo. En este grupo se incluyen virus de baja y media patogenicidad, así como virus no patógenos y las variantes descritas del RHDV. La existencia de protección cruzada entre algunos de estos virus es un aspecto de gran relevancia, por lo que la monitorización de estos virus en las poblaciones y el estudio de su circulación entre los animales, es una de las líneas actuales de investigación.

El RHDV es un virus muy resistente a las condiciones medioambientales, que puede permanecer viable durante varios meses cuando se encuentra protegido por tejidos, incluso a la intemperie. Su inactivación requiere el uso de agentes químicos o la aplicación de temperaturas elevadas sostenidas, lo que dificulta su eliminación de los materiales infectados. Se trata de un virus muy transmisible, capaz de colonizar al hospedador por vía oral, nasal, conjuntival y parenteral y causar una enfermedad mortal con dosis de 10-100 partículas virales. La presencia de estas partículas en los materiales, el agua de bebida, el material de la cama, el pelaje, las heces, orina y secreciones de otros animales, facilita la infección de nuevos individuos. Por otro lado, la posibilidad de transmisión del virus a través de vectores es un elemento de gran importancia tanto en las explotaciones como en el medio ambiente, donde se puede producir la infección en ausencia de contacto directo, a partir del desplazamiento de insectos a grandes distancias. Se ha descrito, además la transmisión del

virus a través de otras especies animales que se alimentan de conejos infectados, mediante la excreción fecal de partículas virales. Los animales que están en contacto directo con material o tejidos infectados pueden, asimismo, transmitir estas partículas infectivas.

Cuando el virus penetra en el organismo por cualquiera de las vías, se produce una difusión hemática que da lugar a la presencia de grandes cantidades de virus en el hígado, donde se produce la replicación, así como en tejidos fuertemente irrigados como el bazo. La diseminación orgánica del virus tiene lugar en pocas horas, tras las que se produce un cuadro, generalmente agudo, que causa la muerte hasta en el 100% de los casos. La posibilidad de desarrollar un cuadro subagudo y crónico existe, aunque no es lo más frecuente. Los animales adultos que se infectan con el RHDV experimentan signos inespecíficos de enfermedad, signos nerviosos y hemorragias, que conducen a la muerte en 12-96 horas. Estos animales muestran signos de fallo hepático fulminante, edema pulmonar y CID. Las lesiones más frecuentes que se encuentran en estos casos son hepatomegalia, decoloración regional de la superficie hepática, esplenomegalia, congestión vascular y hemorragias. Puesto que no existe un tratamiento de la enfermedad, es fundamental la aplicación de sistemas de control y profilaxis sanitaria. El control de la dispersión de la enfermedad implica el aislamiento de los animales enfermos, así como la monitorización del resto de los animales cuando los brotes ocurren en una explotación. La aplicación de una vacunación de emergencia o el sacrificio preventivo, son algunas de las medidas consideradas en estos casos. La prevención de la enfermedad se lleva a cabo mediante vacunación sistemática de los animales con vacunas inactivadas, según los protocolos recomendados.

Recientemente se ha descrito la aparición de una nueva variante del RHDV que afecta a conejos menores de 40 días con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Este nuevo virus, denominado RHDVb, se transmite por las mismas vías que la variante clásica del virus y provoca un cuadro clínico similar, con el inconveniente de que su afinidad por los gazapos altera el equilibrio de las poblaciones al eliminar a una edad temprana a los animales de reposición. El mayor inconveniente que provocó la emergencia de este nuevo virus fue su capacidad de evadir la respuesta inmune inducida por las vacunas clásicas. Esta ausencia de inmunidad cruzada provocó la necesidad de crear nuevas vacunas específicas frente a este virus. En el momento de emergencia de la enfermedad en la Península Ibérica, el genogrupo

circulante era el G1, que fue lentamente desplazado por el RHDVb. Por lo tanto, resulta conveniente proteger a los animales frente a ambas variantes, para evitar una mayor incidencia de la enfermedad.

En esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la evaluación de una nueva vacuna frente al RHDVb en gazapos de 28 días. Durante este estudio se analizaron los efectos que producía la aplicación del producto vacunal sobre animales a una edad temprana, así como su eficacia en la prevención de la enfermedad. Con este objetivo, se enfrentó a los animales a 4 aislados distintos de RHDVb obtenidos a partir de brotes ocurridos en España y caracterizados como nueva variante. Los resultados del estudio indican la idoneidad de esta vacuna para su aplicación en gazapos menores de 30 días, independientemente de su peso en el momento de la vacunación, y la ausencia de efectos secundarios de relevancia. Asimismo, el análisis de la eficacia vacunal frente a los 4 aislados del virus utilizados en este estudio, indica que esta vacuna es capaz de inducir una protección apropiada frente a diferentes cepas del RHDVb.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune producida por los gazapos frente al virus, se realizó un estudio sobre animales vacunados y no vacunados, enfrentados a un inóculo de RHDVb. Se realizaron pruebas laboratoriales para la determinación del título de anticuerpos presente a lo largo del período experimental y se cuantificaron los niveles de IFN γ en los animales. Los datos obtenidos se evaluaron para determinar si la respuesta inmune producida confería suficiente protección frente a la infección viral. Además se ha estudiado la relación existente entre la sintomatología observada y la respuesta inmune producida, con el objetivo de determinar los efectos de la inmunidad sobre el desenlace de la enfermedad. Los resultados de este estudio sugieren la importancia de la modulación de la respuesta inmune en el desarrollo de la enfermedad, con resultados fatales para el animal cuando se produce una respuesta excesiva frente a la infección, independientemente de la presencia de anticuerpos protectores.

Por último, se ha realizado la necropsia sistemática de los animales, y a partir de las muestras obtenidas se realizó un análisis anatomopatológico exhaustivo de diferentes tejidos orgánicos, durante el cual se determinaron las lesiones producidas tras la infección

experimental de los animales con 4 aislados del RHDVb. Asimismo, se realizó un análisis comparativo de las alteraciones observadas en los 4 grupos experimentales, con el objetivo de determinar las posibles diferencias existentes en la patogenicidad de las 4 cepas. Los resultados del estudio anatomopatológico indican la mayor patogenicidad de dos de las cepas. Estos resultados se correlacionan con los datos clínicos observados durante el estudio, por lo que se sugiere que dos de los aislados estudiados poseen un mayor potencial patógeno que los dos restantes. Sería necesario realizar un análisis genético de estos aislados para determinar qué variaciones podrían estar implicadas en los niveles de patogenicidad de las cepas o si este incremento en la patogenicidad de los aislados podría derivar de un fenómeno de recombinación.

I.b. SUMMARY

SUMMARY

Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) was first described in 1984 as a rabbit-specific disease. The first outbreak of RHD was reported in China, where big losses were registered after the importation of angora rabbits from Germany. Initially, losses were attributed to a toxin which could produce an acute haemorrhagic disease in the animals, as some poisons do. However, the most supported hypothesis was that a pathogenic agent was responsible for the disease. The outbreaks expanded during the next few months, causing millions of losses in Asia and then in Europe. The disease spread rapidly across the continent and soon became endemic. The Mediterranean area was especially impacted by this plague due to the broad rabbit populations established in this region. In spite of the control measures, the disease rapidly reached the Americas. The epidemics in this continent were only eradicated in Mexico, which is now the only country able to eliminate the disease from its territory. The enormous virulence and intense capacity of transmission of the disease made it a global and concerning plague. Nevertheless, the RHD outbreak was considered ideal to solve a bigger issue in Australia, which suffered from a rabbit plague that could not be controlled and that was responsible for significant damages to the local ecosystem. Several decades ago, myxomatosis had been introduced in the fields in order to eradicate uncontrolled rabbit populations. However, in a few years, this method lost its initial efficacy, which led to the idea that RHDV could be a useful tool. Despite the controversy, the disease was introduced in Australia and New Zealand in the 1990s and, as a result, it decimated rabbit populations. However, similarly to what happened with myxomatosis, this method lost its impact and rabbits remain an important concern in this area. Nowadays, RHD is endemic in more than 40 countries and it causes sporadic outbreaks that damage the economy and the ecology's balance. In the Iberian Peninsula, both myxomatosis and RHD have caused serious concerns, since rabbits are essential for the ecosystem in this area. The Mediterranean woods are the natural habitat of this species and of several endangered predators, whose survival relies on the presence of rabbits.

In order to control the RHD, studies on the origin of the disease and the characteristics of the virus have been performed ever since the first outbreaks were reported. The aetiological agent of the disease is an RNA virus pertaining to the Family Caliciviridae, Genus Lagovirus,

called Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV). The Lagovirus genus includes lagomorph-specific viruses that are non-cultivable. This characteristic is especially concerning since the lack of a culture media complicates the study of the virus. RHDV is phylogenetically close to other lagomorph caliciviruses, such as the European Brown Hare Syndrome Virus. Thus, both viruses have been extensively studied in order to determine their ability to induce cross-infection, as well as their consistency as two separate viruses. However, despite the cases of RHDV reported in hares, the general thought is that accidental infections are responsible for these cases. Moreover, RHDV is closely related to other rabbit lagoviruses which show moderate to no pathogenicity. Cross-protection among these viruses and RHDV is a big concern; therefore, monitoring these viruses in wild rabbit populations is one of the current most active investigation fields.

RHDV is highly resistant to environmental conditions and it can remain viable for several months in the environment, as long as it is protected by organic tissues. Its inactivation requires the use of chemical agents or maintained high temperatures. This property leads to it being sequestered in organs, infected materials, and surfaces, facilitating its spread. The virus is easily transmissible, as it can enter the host via oral, nasal, conjunctival and parenteral routes. It has been shown that viral amounts of 10 to 100 particles are able to cause lethal disease in animals. The presence of these infective particles in fomites, water, bedding, hair, faeces, urine or secretions, is a source of infection for other animals. Moreover, the virus can be transmitted by vectors, which is not only important in farms, but also in the environment, where long-distance infection could. Mechanical transmission by other species has also been reported. Animals can carry viral particles after direct contact with contaminated tissues, and also excrete viral particles on their faeces after predation or scavenging. Transmission to susceptible hosts can then occur even across large geographical areas. When the virus reaches its host, it spreads through the blood vessels. Viral amounts are highest in the liver, where it replicates, and in strongly irrigated organs, such as the spleen or the lungs. Viral spread within the host occurs in a few hours, causing an acute disease which is lethal in up to 100% of cases. Subacute or chronic infections are less likely to occur. Adult rabbits infected by RHDV show unspecific signs of disease, nervous symptoms and haemorrhages, which lead to death in 12-96 hours. These animals show fulminant hepatic failure, lung oedema and Disseminated Intravascular Coagulation (DIC). The most common lesions observed in these cases are hepatomegaly, pale liver, splenomegaly, vascular

congestion and haemorrhages. Since there is no treatment for the disease, profilaxis is essential. Isolation of suspected animals is needed, as well as monitoring of the rest of the animals. Emergency vaccination or sacrifice can be considered in extreme cases. Extensive vaccination using inactivated vaccines has been proven effective in preventing the disease. A new variant of the virus has been recently described. It infects rabbits under 40 days old and causes high morbidity and mortality rates. The new virus, called RHDVb, shows similar characteristics to RHDV, but is not prevented by classic vaccines due to antigenic differences between both viruses. The lack of effective tools to prevent the disease led to the necessity to create new specific vaccines against RHDVb.

In this Thesis, a new vaccine against RHDVb was assessed in young rabbits, and the immunological effect of RHDVb infection was investigated. During the experimental period, we analyzed the effects of the vaccine on the animals when applied at an early age, as well as its efficacy in preventing the disease. The rabbits were exposed to 4 different RHDVb isolates recovered from outbreaks that occurred in Spain. Our results show the efficacy of the vaccine for its use in rabbits younger than 30 days old and the lack of relevant adverse effects. Moreover, our results show that the vaccine confers protection against different isolates of the virus. In order to evaluate the immune response mounted against the virus, we performed assays that measure the specific antibody titrations and IFN γ levels throughout the experimental period. The results were analyzed to determine if the immune response conferred effective protection against the infection. Moreover, we studied the correlation between the clinical signs and the immune response, in order to assess the effects of the latter on the outcome of the disease. Our results suggest that immune modulation is essential in the development of the disease, since animals showing an exacerbated immune response are more prone to develop a fatal outcome, even when antibody titrations are protective. Finally, we performed systematic necropsies of all the animals and recovered tissue samples for anatomopathological study. We analyzed and compared the lesions observed after infection with 4 different RHDVb isolates, in order to determine different pathogenicity rates in between the isolates. Our results indicate that two of the strains show higher pathogenicity, which falls in line with the clinical observations for these isolates. However, it is necessary to perform further analysis to assess if any genetic differences can be noted, or if any of these isolates show recombinant phenomena which could be involved their higher virulence.

II. LISTADO DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BUN	Blood urea nitrogen
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
CK	Citoquinas
CLP	Core-like particles / Partículas similares al núcleo
DO	Densidad Óptica
Dpi	Días post-infección
Dpv	Días post-vacunación
EBHS	European Brown Hare Syndrome / Síndrome de la Liebre Parda Europea
EBHSV	European Brown Hare Syndrome Virus / Virus del Síndrome de la Liebre Parda Europea
EHC	Enfermedad Hemorrágica del Conejo
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCV	Feline Calicivirus
GMD	Ganancia Media Diaria
GGT	Gamma glutamil transferasa
HA	Hemaglutinación
HBGA	Histo-Blood Group Antigens
Hpi	Horas post-infección
HpV	Horas post-vacunación

IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulinas
IHA	Inhibición de la Hemaglutinación
IL	Interleukinas
MRCV	Michigan Rabbit Calicivirus
NCB3	Nivel de Contención Biológica 3
NK	Natural Killer Cells
NV	Norovirus
ORF	Open Reading Frame / Marco de lectura abierta
RCV	Rabbit Calicivirus
RHD	Rabbit Haemorrhagic Disease / Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo
RHDV	Rabbit Haemorrhagic Disease Virus / Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo
SLS	Standard Laboratory Strain
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
TNF	Tumoral Necrosis Factor
VEHC	Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo
VFS	Virus del Fibroma de Shope
VLP	Virus-like particles / Partículas similares al virus

III. LISTADO DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1 Taxonomía de los lagomorfos (adaptado de Suckow, 2012).
- Figura 2 Diarreas en conejos (A, B). La presencia de restos fecales en la región perineal es un signo clínico indicativo de esta patología en el conejo.
- Figura 3 Coccidiosis en intestino de conejo (Tinción H/E). Se observan formas parasitarias en diferentes fases (asterisco) a lo largo del epitelio intestinal.
- Figura 4 Coccidiosis en intestino de conejo (Tinción H/E). Se observan lesiones en el epitelio intestinal y diferentes fases parasitarias (A, B).
- Figura 5 Corte histológico de intestino de conejo (Tinción H/E) con presencia de *Cyniclomyces guttulatus*. Se observan microorganismos completos (flechas sólidas) e incompletos (flechas con línea de puntos). Presencia de abundante moco y *Cyniclomyces guttulatus* en contenido intestinal.
- Figura 6 Esquema del ARNg del RHDV (adaptado de VVAA). Se destacan las proteínas estructurales (recuadro).
- Figura 7 Esquema del ARNsg del RHDV (adaptado de VVAA).

CAPÍTULO 1

- Figura 8 Mantenimiento de los animales durante el período experimental.
- Figura 9 Procedimientos clínicos realizados durante el período experimental. (A) Medición del peso. (B) Medición de la temperatura. (C) Vacunación. (D) Infección.
- Figura 10 Realización del test diagnóstico inmunocromatográfico. (A) Aplicación del macerado de hígado en los pocillos A (RHDV) y B (RHDVb). (B) Tiempo de espera. (C) Aparición de la línea control (verde) en las ventanas de

resultados A y B. (D) Aparición de las líneas de resultado (rojo) en las ventanas A y B.

- Figura 11 Nódulos vacunales de diferentes tamaños observados en los animales (flecha).
- Figura 12 Resultados del test inmunocromatográfico realizado *in situ* a partir de tejido hepático (A) Resultado positivo a RHDVb, perteneciente a un animal infectado por el virus. (B) Resultado negativo, perteneciente a un animal del grupo vacunal. (C) Resultado positivo a RHDV (columna A) y RHDVb (columna B).

CAPÍTULO 2

- Figura 13 Procedimiento de toma de muestras de sangre.
- Figura 14 Procedimiento de preparación de los inóculos virales para la infección.
- Figura 15 Imagen de la placa ELISA-DAS. Se señalan los controles positivo (sup) y negativo (inf).
- Figura 16 Esquema del procedimiento de IHA. 1. Separación del suero de las muestras de sangre. 2. Incubación de suero con antígeno y GR-B. 3. Resultados de la titulación. Se señalan los controles negativo y positivo.
- Figura 17 Representación de los niveles medios de IFN γ en los 3 grupos de animales a lo largo del período experimental.
- Figura 18 La gráfica representa el título medio de anticuerpos de los 3 grupos, en Unidades Hemaglutinantes (UH), durante el período experimental.

CAPÍTULO 3

- Figura 19 Congestión de la conjuntiva en un conejo afectado por el virus (A).
Conjuntiva de un conejo sano (B).

- Figura 20 Diferentes grados de epistaxis observados en animales afectados por el virus. (A) Epistaxis profusa. (B) Exudado nasal espumoso, sero-sanguinolento. (C, D) Exudado nasal mixto, seroso-mucoso y sanguinolento.
- Figura 21 Cavity abdominal de un gazapo infectado por el RHDVb. Se aprecia una marcada congestión orgánica, así como una ligera hepatomegalia y esplenomegalia.
- Figura 22 Imagen macroscópica de las cavidades orgánicas de un conejo no infectado por el RHDVb, donde se aprecia la coloración uniforme y rojiza del hígado (A). Detalle de la superficie hepática de un conejo sano (B).
- Figura 23 Imagen de la cavidad abdominal (A) donde se aprecia el incremento en el tamaño relativo del bazo. (B) Imagen microscópica del tejido esplénico (H/E) en la que se observan signos de hemosiderosis. H&E 20x.
- Figura 24 Imagen macroscópica de la cavidad celómica de un conejo infectado con RHDVb. (A) Se aprecia una intensa hepatomegalia asociada con una fuerte decoloración de la superficie hepática (áreas de necrosis). Los pulmones muestran una superficie de coloración oscura e irregular, con presencia de numerosas hemorragias en la superficie pleural. Presencia de abundante líquido ambarino libre en cavidad torácica. (B) Imagen macroscópica de la cavidad celómica de un conejo infectado con RHDVb. (C) La coloración de la superficie hepática se muestra parcheada y se aprecia hepatomegalia. Los pulmones aparecen no colapsados, con dibujo lobulillar marcado por el edema septal, mostrando una coloración clara sobre la que destacan la presencia de abundantes petequias. Se aprecia congestión cardíaca. (D) Aspecto de la cavidad visceral tras retirar el hígado. El pulmón presenta una coloración irregular acompañada de focos prominentes de enfisema que se alternan con zonas deprimidas de atelectasia. Presencia de focos de hemorragia en la serosa gástrica e intestinal.

- Figura 25 Aspecto macroscópico del hígado de 4 animales infectados por el RHDVb. Se observa incremento de tamaño del órgano (A, B, D), textura friable (A, B), decoloración superficial difusa tanto en la cara parietal (A, B, D) como visceral (C) y patrón lobulillar marcado (E, F). Este hallazgo es recurrente en animales infectados por el virus.
- Figura 26 Detalle de la superficie hepática de conejos infectados por el RHDVb. Se aprecian áreas de necrosis (A), así como un patrón lobulillar superficial (A, B).
- Figura 27 Imágenes microscópicas del parénquima hepático. (A) Tejido hepático sano. H&E 4x. (B) Necrosis hepática causada por el RHDVb. H&E 2,5x. (C, D) Microvacuolización de los hepatocitos con pérdida de la estructura lobulillar. H&E 4x y 40x. (E) Detalle de los hepatocitos en diferentes fases de degeneración hidrópica con microvacuolización citoplásmica. Se aprecia congestión sinusal. H&E 20x. (F) Detalle de la vena centrolobulillar con marcada congestión. H&E 20x.
- Figura 28 Imagen macroscópica de corazón y pulmones de 4 animales afectados por el RHDVb. Se aprecia cómo los pulmones no aparecen colapsados (pulmón de shock). Imagen parcheada con coloración irregular de la superficie pulmonar (A, C) con presencia de abundantes focos de hemorragia. Intensa congestión (B, D). El corazón muestra congestión vascular en todos los casos.
- Figura 29 Imágenes microscópicas de pulmón de animales infectados por el RHDVb. Se aprecia activación del tejido linfoide asociado a bronquios (A). H&E 4x. Engrosamiento de la túnica adventicia de los vasos (B, C). H&E 4x. Marcado engrosamiento de los tabiques interalveolares, congestión (A, B, C, D, E) y edema (E, F). Imagen de shock pulmonar (E, F). H&E 10x.
- Figura 30 Riñones afectados por el virus. Se aprecia congestión severa de cortical y medular (A, B).

- Figura 31 Imágenes histológicas de riñón. Se aprecia congestión vascular e intensa hemorragia intersticial (A, B, C, D). H&E 4x. Cilindros hialinos (A, D), y degeneración vacuolar citoplásmica con presencia de algunas células epiteliales en fase de necrosis (B). H&E 10x.
- Figura 32 Linfonódulo poplíteo de un conejo infectado por el RHDVb (A). Se observa congestión e incremento de tamaño. (B) Linfonódulos mesentéricos de un conejo afectado por el virus con marcada hipertrofia.
- Figura 33 Encéfalo de un animal infectado por el RHDVb, donde se observa congestión vascular y lesiones de tipo hemorrágico multifocal a nivel de la meninge (A). Imagen microscópica del timo de un animal infectado por el virus (H/E) que muestra congestión y hemorragia intensas a nivel medular con depleción linfoide. H&E 2x.
- Figura 34 Imagen histológica de la tráquea de un animal afectado por el RHDV. Se observa denudación ciliar epitelial con marcada dilatación de las glándulas mucosas traqueales con pequeños (A) y grandes aumentos (B). H&E 2x y 10x.

IV. LISTADO DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I	Especies de Eimeria que afectan al conejo (adaptado de Cordero del Campillo, 1999).
Tabla II	Grados de virulencia establecidos para el virus mixoma.
Tabla III	Aparición de los primeros brotes de RHDV en diferentes países del Mundo.
Tabla IV	Patrón de aglutinación de eritrocitos humanos (A, B, O) para los genogrupos de RHDV y la variante RHDVb (adaptado de Nyström, 2011). HA débil (+), fuerte (+++), negativa (-).
Tabla V	Aparición de las primeras variantes del RHDV en diferentes países del Mundo.

CAPÍTULO 1

Tabla VI	Peso medio inicial de los diferentes grupos.
Tabla VII	Ganancia Media Diaria (GMD) de los diferentes grupos.
Tabla VIII	Resultados del estudio vacunal. Número y porcentaje de ACM (Animales Control Muertos), AVM (Animales Vacunados Muertos) y FP (Fracción Prevenible).

CAPÍTULO 2

Tabla IX Valores medios de IFN γ (ng/ μ L) en los 3 grupos durante el período experimental. Vac: vacunación, hpv: horas post-vacunación, dpv: días post-vacunación, Inf: infección, hpi: horas post-infección.

CAPÍTULO 3

Tabla X Signos clínicos observados en los animales de los grupos 1-4.

Tabla XI Hallazgos macroscópicos en los animales de los grupos 1-4 (%).

Tabla XII Hallazgos histológicos en los animales de los grupos 1-4 (%).

*“Cuando yo era un crío, debajo de cada ramo salía uno, y las zarzas estaban llenas de ellos,
ahí al fresco; hasta que vino la peste esa y se acabaron los conejos”*

(S.J.H.)

V. INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA DEL CONEJO EN NUESTRA SOCIEDAD

1.1 Evolución y taxonomía de la especie

El conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus*, es un pequeño mamífero originario de la Península Ibérica (Pinheiro, 2015; Suckow, 2012), cuyo ecosistema natural es el monte mediterráneo. Los primeros restos de conejo de los que se tiene constancia proceden del Sur de España, concretamente de Andalucía, y pertenecen a *Oryctolagus laynensis*, considerado el ancestro más remoto del conejo actual (Donard, 1982; López-Martínez, 1989; Alda, 2008; López-Martínez, 2008; Suckow, 2012). Se estima que *Oryctolagus laynensis* ocupó Iberia hace 3 millones de años, y a pesar de la coexistencia de otras especies relacionadas, como *O. lacosti* y *O. burgi*, de mayor tamaño y robustez, se considera que es la especie más próxima a *O. cuniculus* (Alda, 2008). Al final del Paleolítico, todas las especies, excepto *O. cuniculus* se habían extinguido (Suckow, 2012).

Se cree que esta especie se extendió hacia Europa y el Norte de África, quedando aislada en la Península Ibérica durante un período glacial que determinó su localización definitiva en la península (López-Martínez, 2008). Parece probable que durante esta etapa se diferenciaron las dos subespecies de conejo que existen en la actualidad en la Península y sus islas (Branco 2000; Branco, 2002). Por un lado, *Oryctolagus cuniculus cuniculus* (Linneo, 1758), que se extendió por el Noreste de la península, y dio lugar a todas las poblaciones europeas, y por otro *O. cuniculus algirus* (Loche, 1867), que se distribuyó hacia el Suroeste de la Península, alcanzando además las islas atlánticas de España y Portugal (Pinheiro, 2015). La línea imaginaria que une el noroeste y el sureste de la península fue ocupada por una población mixta formada por ambas especies (Branco 2000; Branco, 2002; Suckow, 2012), en la que se supone que ambas subespecies han podido hibridar.

La clasificación taxonómica de los lagomorfos ha sido controvertida desde sus inicios, debido en parte a las similitudes morfológicas que presenta respecto a las liebres y los roedores. Plinio el viejo (23-79 d.C.) en su libro “Historia Natural”, describió el conejo como un tipo de liebre que habitaba la Península Ibérica¹ (Sandford, 1992). Tradicionalmente se han asimilado al mismo grupo que los roedores, debido a sus características físicas (Meng and Wyss, 2005; Rose, 2006) y la creación de un único grupo denominado *Glires*, que incluyera a todos estos mamíferos, fue propuesta por Linneo (Rose, 2006). Fue también Linneo, en 1758, quien acuñó el término *Lepus cuniculus* para señalar el grupo compuesto por las liebres, el

¹ “...Existe también una especie de liebre en España que se denomina *cuniculus*...”

conejo europeo y el conejo de cola de algodón; en 1873 se distinguió *Oryctolagus cuniculus* del resto de lagomorfos del grupo (Angermann, 1990; Hoffman, 1993), aunque se continuó incluido en el género *Lepus* (Corbet, 1994). En la actualidad, el conejo europeo, el de cola de algodón y la liebre pertenecen a 3 géneros diferentes de la misma Familia, como se aprecia en la Figura 1.

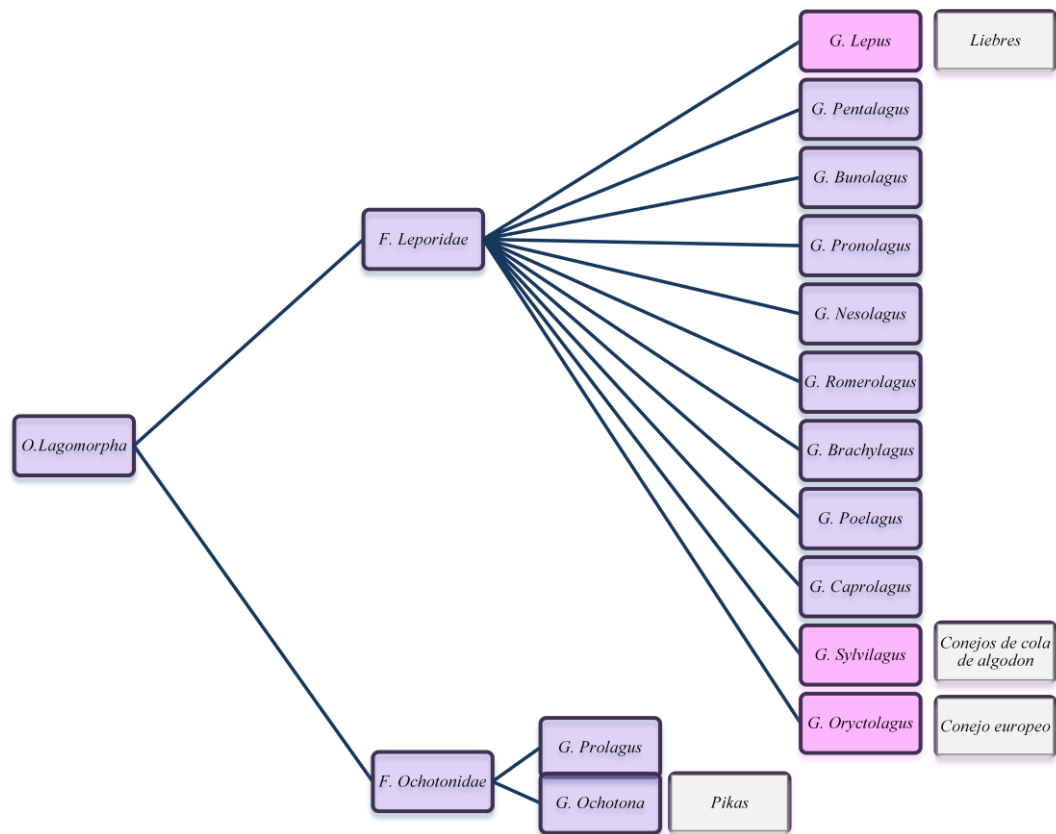


Figura 1. Taxonomía de los lagomorfos (adaptado de Suckow, 2012)

El Orden *Lagomorpha*, propuesto por Gridley en 1912 con el objetivo de distinguir los lagomorfos de los roedores, agrupa a conejos, liebres y pikas (Chapman and Flux, 1990; Pinheiro, 2015). Está formado por la Familia *Ochotonidae*, que incluye las diferentes especies de pika, distribuidas en dos géneros, y la Familia *Leporidae*, que agrupa conejos y liebres. Esta familia está constituida por 11 géneros: el Género *Lepus*, incluye las liebres, mientras que los 10 géneros restantes, incluyen las diferentes especies de conejo. Es interesante destacar el Género *Oryctolagus*, cuya única especie es el conejo europeo, *O. cuniculus*, con las dos subespecies mencionadas anteriormente (Suckow, 2012; Pinheiro, 2015).

1.2 Historia de la co-evolución entre el hombre y el conejo

Las excavaciones arqueológicas muestran la importancia del conejo en las sociedades primitivas, hallándose restos óseos de estos animales junto con los restos humanos. Los primeros restos fósiles de conejo que sugieren que este animal formaba parte de la dieta humana, datan del Paleolítico Superior y se expanden durante esta transición entre el final del Pleistoceno y el inicio del Holoceno. La importancia del conejo en las sociedades primitivas de la Península parece responder, no sólo a motivos nutricionales, sino a otras posibilidades, como la de utilizar sus huesos para fabricar útiles, y sus pieles para cubrirse (Rufà, 2017). El siguiente acontecimiento reseñable en la relación entre el ser humano y el conejo, es el inicio de su manejo, que se encuentra documentado hacia el 2000 a.C (Reumer, 1984; Vigne, 1988; Monnerot, 1994). La cultura fenicia (1000 a.C.) fue la primera en registrar la presencia de estos animales en la Península Ibérica y las islas Baleares (Suckow, 2012). Se cree que estos navegantes, al confundir al conejo con los damanes, abundantes en la región de la que provenían, le dieron a la Península el nombre “I-saphan-im”, que dio lugar posteriormente al término “Hispania”. Este vocablo de origen púnico, hacía referencia a la abundancia de conejos en las tierras y costas de la Península Ibérica, que se ha conocido coloquialmente como “costa o tierra de conejos” (Gómez, 2015; Rougeot, 1981; Rosell, 2000).

Durante la época clásica, el conejo fue una alegoría de la fertilidad y símbolo de Hispania. Durante el imperio de Adriano se acuñaron diferentes monedas (aureo, denario, sextercio, dupondio y as) con la imagen del emperador en el anverso, e Hispania representada con un conejo a sus pies en el reverso, según describe Benagés (Rogers, 1994; Rosell, 2000). En el siglo I a.C., la Península fue calificada por Cátulo (87-57 a.C.) como *cuniculosa*, palabra derivada del término latino “cuniculus”, que se refiere a “guaridas” (Camps, 1994). Este vocablo parece proceder del griego “ko(n)niklos”, o del ibérico “kýniklos”, que el autor Polibio (200-118 a.C.) atribuyó a las “liebrecejas” que observó a su paso por las costas mediterráneas². Sin embargo, la presencia de conejos en el Imperio Romano fue también motivo de controversia, como se ha documentado debido a las múltiples plagas que afectaron gravemente a la agricultura, especialmente en las islas (Clutton-Brock, 1999; Fox, 1994). La primera plaga de conejos de la que se tiene constancia tuvo lugar en Baleares³ (Sandford, 1992), debido a la actividad de las entonces denominadas “lebérides”, que horadaban la tierra

² “...Visto de lejos se asemeja a una liebre pequeña; mas cuando se le apresa en la mano se ve que tiene otra figura muy diferente, sabiendo también de modo diferente al comerlo. Vive la mayor parte del tiempo bajo tierra...” (Iberia, Estrabón, en Gómez, 2015)

³ “...es extremadamente prolífico y ha llegado a causar hambre en las Baleares al haber destruido las cosechas...También es conocido el hecho de que los habitantes de las islas Baleares pidieron ayuda al Emperador Augusto para que les enviara soldados para combatir la plaga de estos animales...” (Plinio, en Sandford, 1992)

y destruían los árboles. Como relata Estrabón (61-21 d.C.), los habitantes de las islas llegaron a pedir ayuda al Imperio Romano, puesto que estos animales, “imposibles de combatir” les expulsaban de sus propias tierras⁴.

Es conocido que tanto fenicios como romanos, grandes navegantes y conquistadores, transportaban conejos en sus viajes. De esta manera, se establecían poblaciones de conejos que servían como fuente de alimento en las islas que conquistaban, además de fomentar la actividad lúdica de la caza (Suckow, 2012), y a pesar de la controversia creada con las plagas. Sin embargo, la Historia de la domesticación del conejo es poco clara y, en parte procede de conjeturas (Suckow, 2012). Se tiene certeza de que los romanos criaban conejos en cautividad con el objetivo de consumir su carne. Esta civilización se considera muy aficionada a la carne de conejo, en especial al consumo de gazapos⁵ y fetos o *laurices*, que obtenían de los animales que criaban en pequeñas extensiones de terreno llamadas *leporaria*. Esta actividad está ampliamente descrita por Varrón (116-27 a.C.) en su obra “De Re Rustica” (Sandford, 1992), donde describe la *leporaria* como un recinto donde se mantienen los animales para facilitar posteriormente su caza (Camps, 1994; Rosell, 2000). Sin embargo, estos recintos parecen asemejarse más a reservas naturales delimitadas, que a criaderos dirigidos por el hombre.

Aunque es evidente que el conejo se mantenía en cautividad para obtener alimento muchos siglos antes, se considera que su domesticación fue la más tardía de todos los pequeños animales (perros, gatos, hurones), sin estar plenamente establecida hasta la Edad Media (Sandford, 1992; Suckow, 2012). En esta época continuaba siendo frecuente la cría de conejos para su consumo, tanto a nivel familiar como en los monasterios, donde los monjes contaban con *clapiers*, recintos similares a los antiguos *leporaria*, donde se criaban conejos (Rosell, 2000). El resto de la sociedad, en especial las clases menos favorecidas económicamente, participaba de este manjar a partir de la caza.

En la Edad Moderna y Contemporánea, el conejo ha colonizado todos los continentes excepto la Antártida (Flux, 1994). Forma parte del ecosistema de muchas regiones del Planeta, que muestran diferentes perspectivas respecto a su presencia. En países como Australia y Nueva Zelanda, donde el conejo fue introducido de manera irregular, en la actualidad constituye una plaga que amenaza la supervivencia de sus especies vegetales y

⁴ “...En Iberia hay pocos animales dañinos, excepto las *lebérides* que agujerean la tierra...” (Iberia, Estrabón, en Gómez, 2015)

⁵ “...los gazapos recién nacidos o lactantes, sin desollarlos, son considerados un alimento exquisito...” (Plinio, en Sanford, 1992)

animales autóctonas. Sin embargo, en otras regiones del Planeta, como la Península Ibérica, constituye parte fundamental del equilibrio del ecosistema Mediterráneo.

Actualmente existen más de 50 razas de conejo que se crían para la producción de carne, piel y pelo (González, 2016). Además, es un recurso cinegético habitual y un animal de investigación muypreciado, que hoy en día constituye un animal de compañía completamente integrado en la sociedad occidental.

1.3 El conejo silvestre

1.3.1 Importancia del conejo en el ecosistema Mediterráneo

El conejo es un elemento esencial en el ecosistema mediterráneo (Alda, 2008; Alda, 2010), y en la actualidad se considera una de las especies vulnerables de la Península Ibérica (Villafuerte, 2017). Esta especie se encuentra en la base de la cadena alimentaria, por lo que cuenta con decenas de depredadores, algunos de los cuales lo consumen como parte importante de su dieta. Entre estas especies de carnívoros, se encuentran mamíferos de mediano tamaño, como el zorro (*Vulpes vulpes*), el gato montés (*Felis silvestris*), los mustélidos y diversas especies de aves rapaces.

Sin embargo, los depredadores más condicionados por la presencia de conejos en el campo son el Lince Ibérico (*Lynx pardinus*) y el Águila Imperial (*Aquila adalberti*), especies actualmente en peligro de extinción (González, 2017; Calzada, 2017). En ambos casos, se trata de especies ibéricas que se alimentan fundamentalmente de conejos, y cuyas poblaciones se vieron afectadas durante las epidemias de mixomatosis y de enfermedad hemorrágica vírica que sufrieron a mediados y finales del siglo XX (Rosell, 2000).

En el caso del lince ibérico, la situación es especialmente preocupante, ya que más del 90% de su dieta está constituida por el conejo, alimentándose en menor medida de ciervos (*Cervus elaphus*), gamos (*Dama dama*), perdices (*Alectoris rufa*) y sólo de forma ocasional de mamíferos o anátidos (Calzada, 2017). Esta especie es endémica de la Península Ibérica y se encuentra restringida a pequeñas poblaciones en la zona suroeste de la misma, por lo que cualquier disrupción en el ecosistema es susceptible de alterar el equilibrio en sus poblaciones. Un ejemplo de este problema es la evidencia, recientemente señalada, de que las tasas reproductivas del lince empeoran en ausencia de su alimento básico, el conejo (Monterroso, 2016). Este hecho, junto con el número de bajas producidas por atropellos que sufre la especie durante sus desplazamientos territoriales, la presencia de enfermedades y la

destrucción del monte mediterráneo, son factores que desequilibran notablemente el número de individuos que componen las poblaciones, dificultando la recuperación de esta especie emblemática en la Península Ibérica.

1.3.2 Características fisiológicas y etológicas del conejo silvestre

El conejo, *Oryctolagus cuniculus*, muestra en su nombre algunas de sus características más importantes. El término que da nombre al género, procede de dos términos griegos, “oruktês”: *excavador* y “lagôs”: *liebre* (Rosell, 2000), que podrían traducirse como “excavador con aspecto de liebre” (Muñoz, 2012). Este hecho hace alusión a la construcción de madrigueras excavadas bajo el suelo o formadas en el hueco entre las piedras, donde los conejos habitan. Estas madrigueras mantienen unas condiciones climáticas apropiadas para la supervivencia del animal (aproximadamente 20°C y buena ventilación) que permiten su huida de los depredadores y la seguridad de las crías, ocultas en gazaperas o madrigueras de cría. Este tipo especial de galerías cuenta con un amplio espacio en el fondo, donde la hembra puede dejar a los gazapos para salir al exterior y alimentarse.

El conejo es un animal sedentario, excavador, gregario, jerárquico y territorial. Ocupa extensiones fijas de terreno, donde se establece junto con su grupo familiar y donde excava galerías para ocultarse y protegerse. A pesar de la gran similitud entre las dos subespecies que conforman el Género *Oryctolagus*, se ha determinado que éstas muestran ciertas diferencias de comportamiento: *O. cuniculus cuniculus* se considera un animal social y excavador, con un tipo de comportamiento denominado *de campiña, de madriguera o subterráneo*. Esta actitud es propia de animales muy gregarios, de carácter tímido y asustadizo, que pasan gran parte del tiempo en la madriguera ya que habitan ecosistemas en los que es difícil encontrar abrigo, como son las zonas de cultivo.

Sin embargo, *O. cuniculus algirus*, parece mostrar una actitud menos social, formando grupos familiares más pequeños, y experimenta una mayor actividad de superficie. Este tipo de comportamiento, *de sierra, matorral o superficie*, es característico de individuos que habitan zonas arbustivas, en extensiones formadas por cerros y colinas, donde pueden esconderse fácilmente de los depredadores (Muñoz, 2012). Es posible que, al menos en parte, estas diferencias comportamentales se deban a la región geográfica que habita cada una de las subespecies, pudiendo constituir, por tanto, una diferencia adaptativa al medio.

El conejo posee hábitos crepusculares y nocturnos, característica que se desarrolla especialmente en época de caza o de mayor presencia de depredadores. Sin embargo, sus hábitos no son estáticos, ya que se trata de animales muy adaptables a las condiciones del ecosistema. Esta plasticidad es una de las características que explican el éxito del conejo en la colonización de nuevos territorios. Su alimentación consta en gran parte de brotes vegetales verdes, lo que disminuye su consumo de agua, aunque en condiciones adversas puede alimentarse de una gran variedad de recursos vegetales. Un elemento fundamental de su fisiología es la cecotrofia, mediante la que ingiere un tipo de heces denominados cecotrofos que le proporcionan, en una segunda digestión, un mayor aprovechamiento del alimento ingerido. De esta manera, el conejo es capaz de utilizar recursos vegetales que no serían nutritivos para otras especies, lo que constituye una ventaja adaptativa.

Es necesario destacar la capacidad reproductiva de este animal, característica que constituye un elemento clave en la supervivencia y distribución de la especie. Se calcula que el conejo silvestre tiene unos 4 partos por año, con gestaciones que duran alrededor de 30 días, y un número de crías por parto de entre 3 y 6, como media. El aumento en la fertilidad y fecundidad de esta especie se han desarrollado de forma paralela a su domesticación (Sandford, 1992) y este incremento en las tasas reproductivas ha favorecido tanto la producción industrial, como la reposición de las poblaciones de conejo en su ecosistema y la expansión a nuevos territorios.

1.3.3 El conejo silvestre y la actividad cinegética

La caza del conejo es una actividad de la que se tiene constancia desde el Paleolítico (Alda, 2010; Suckow, 2012; Rufà, 2017). La excelente agilidad de este animal, cuya captura supone un reto, así como las características de su carne y su pelaje, hacen que el conejo haya sido una presa de gran interés desde la Antigüedad (Rufà, 2017). En las diferentes culturas y épocas, la actividad cinegética se ha desarrollado utilizando diferentes herramientas (cuchillos, lanzas, redes, armas de fuego) y, en ocasiones se ha utilizado la ayuda de animales como perros, hurones, comadreas⁶ o aves rapaces (Muñoz, 2012). La actividad cinegética resultaba tan importante en las sociedades del pasado que los navegantes de la época clásica solían portar con ellos pequeñas poblaciones de conejos para desarrollar esta actividad en las regiones donde se establecían (Suckow, 2012). Mediante esta actividad, el conejo se distribuyó ampliamente, adaptándose a nuevos nichos ecológicos.

⁶ Iberia, Estrabón, en Gómez, 2015

La gran tradición que muestra la cultura europea hacia la caza del conejo, y que se remonta a la Prehistoria, fue el origen de la introducción de esta actividad en otras regiones del planeta, como Australia, donde tanto el conejo como la actividad lúdica de la caza fueron introducidas a mediados del siglo XIX (Kovaliski, 2013). En esta región, las condiciones medioambientales y los amplios espacios abiertos constituían un emplazamiento ideal para realizar esta actividad. En la actualidad, la caza del conejo continúa siendo una actividad de gran tradición en la Península Ibérica, así como en otras regiones del Mediterráneo, y la carne de conejo, especialmente silvestre, es muy apreciada.

No obstante, la caza de conejos no siempre ha sido una actividad lúdica propia de las clases sociales más privilegiadas. Durante las épocas de escasez económica y en los períodos de guerra, la caza del conejo ha constituido una actividad especialmente importante, fundamentalmente en las áreas rurales. La adquisición de estas piezas constituía una fuente de ingresos para las familias y proporcionaba a las poblaciones una fuente de proteína de gran calidad, que no podrían haber conseguido de otro modo. Hoy en día, este tipo de caza de supervivencia sigue existiendo en las regiones más deprimidas del Planeta, en las que el conejo es un recurso alimentario adicional que aporta gran cantidad de nutrientes a la dieta de estas poblaciones (Sandford, 1992).

1.4 El conejo doméstico y la actividad productiva

Como se ha reseñado en el apartado 1.2., existe constancia de la cría de conejos para consumo humano desde aproximadamente 1000 años a.C., si bien la domesticación propiamente dicha no tuvo lugar hasta la Edad Media (Rosell, 2000; Suckow, 2012). El tipo de explotación tradicional puede estar formada por alojamientos cerrados donde los animales realizan todo su ciclo vital, o bien estar constituida por un pequeño recinto donde los animales tienen un espacio abierto para moverse y alimentarse, anexo a los alojamientos donde se pueden ocultar y descansar.

En Europa, las explotaciones cunícolas comenzaron a aumentar su tamaño alrededor de los años 20, considerándose que la etapa industrial de producción de conejos comenzó a partir de los años 60 (Rosell, 2000). La producción de conejos se ha intensificado desde el siglo XX y, actualmente, las explotaciones de tipo familiar son muy escasas. Los conejos se producen industrialmente con dos objetivos: la producción de piel y de carne. Las razas peleteras, que proporcionan productos como la lana de angora, fueron muy populares en Europa durante los siglos pasados debido al auge de la industria sombrerera, mientras que

actualmente se explotan fundamentalmente en la región asiática (Rosell, 2000). La producción de carne, sin embargo, presenta una distribución más amplia. Si bien su consumo es minoritario en muchas regiones del Planeta, en los países de la Cuenca Mediterránea forma parte de la dieta tradicional.

Las razas de producción cárnica son razas mejoradas para esta aptitud respecto al conejo silvestre. Mientras que *O. c. cuniculus* alcanza un peso vivo de 1,5-2 Kg, y *O. c. algirus*, de 0,9-1,3 Kg (Villafuerte, 2017), las razas de conejo que se emplean para producción cárnica son razas de tamaño algo mayor, cuyo peso vivo es de unos 4 kg en el adulto. Se trata de animales de buen manejo y adaptados a la cría en cautividad durante generaciones, al contrario de las especies silvestres, que son naturalmente esquivas. Estas razas cárnicas alcanzan la pubertad a partir de los 5 meses, frente a los 9 meses en *O. c. cuniculus* y 4 en *O. c. algirus*, y la cubrición tiene lugar cuando las hembras alcanzan el 80% de su peso adulto. En algunas ocasiones se realiza cubrición por monta natural, aunque la inseminación artificial se está convirtiendo en el método de elección, ya que implica un mayor rendimiento productivo.

Tras una gestación de 29-31 días, las hembras tienen una camada cuyo tamaño oscila entre 3 y 12 gazapos, siendo lo más frecuente encontrar camadas de 7 a 9 animales. La lactación dura alrededor de un mes, dependiendo del nivel de intensificación, y a continuación los gazapos pasan a cebo, donde se encuentran hasta su envío a matadero, aproximadamente a los 2 meses de edad. Por su parte, las hembras vuelven a cubrirse en su siguiente período fértil, y realizan este mismo proceso durante todo su ciclo productivo.

1.5 El conejo en investigación

El uso de los conejos como animales de investigación *in vivo* es muy reciente y se remonta a mediados del siglo XIX, en que se llevó a cabo lo que podría llamarse el primer ensayo farmacológico utilizando animales de laboratorio. El responsable fue el físico austriaco Schroff, quien evidenció los efectos derivados del principio activo de la belladona (*Atropa belladonna*) sobre conejos que se habían alimentado con dicha planta (Stormont and Suzuki, 1970; Liebenberg and Linn, 1980; Suckow, 2012).

Debido a su tamaño relativamente pequeño, a su facilidad de manejo, al éxito de su cría en cautividad, y a su corto tiempo de generación, el conejo se convirtió en menos de un siglo en un elemento indispensable en la investigación. La raza de conejo de uso más

frecuente ha sido el Blanco de Nueva Zelanda, un animal cuyo peso no excede los 6 Kg y que se popularizó tras el desarrollo de los test de irritación de Draize (1944). En la actualidad, los animales destinados a su uso en laboratorios se crían en centros especializados que pueden proporcionar conejos convencionales, así como libres de patógenos específicos. De esta manera, el origen, la genética y la inmunidad de los animales resultan homogéneos y conocidos.

La necesidad de regular el trabajo con animales en los laboratorios, que comenzó a hacerse habitual a partir de los años 30, provocó la publicación del primer documento que regulaba la investigación con animales, titulado “Principles of Humane Experimental Technique”, en 1959 (Russell and Burch). En este documento aparece por primera vez la llamada *Regla de las 3 R*, que representan *Reducción*, *Reemplazamiento* y *Refinamiento*. Como primera medida, la *Reducción* consiste en la aplicación de diseños estadísticos que reduzcan al mínimo el número de animales necesarios para el estudio. El *Reemplazamiento* consiste en la sustitución de los animales de experimentación por material no sensible, siempre que el ensayo lo permita. Por último, el *Refinamiento* se refiere al empleo de los métodos necesarios para minimizar el daño infligido a los animales durante los distintos procedimientos experimentales.

A partir de dicho momento, la legislación en materia de investigación con animales vivos continuó avanzando y se elaboraron modificaciones legislativas con el objetivo de ampliar las condiciones a cumplir en los estudios científicos. Un ejemplo de esta legislación es el “Convenio europeo sobre la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos” (1983). En la actualidad, existe una amplia legislación que regula la investigación con animales en todas sus formas, tanto a nivel regional (Comunidades Autónomas), como a nivel nacional e internacional. La publicación de resultados científicos en medios especializados exige que todos los procedimientos experimentales llevados a cabo cumplan la legislación relativa a animales de experimentación. Debido a la aplicación de estas leyes, el número de animales utilizados en investigación ha disminuido notablemente, si bien continúa siendo imprescindible en estudios preclínicos y estudios de evaluación de la toxicidad de fármacos.

1.6 El conejo de compañía

La aptitud más reciente que ha desarrollado el conejo es la de animal de compañía. Considerando las características del conejo, es sencillo pensar que quizá ya constituyera un

animal de compañía en las sociedades del pasado. Puesto que son animales dóciles y de aspecto amable, es intuitivo imaginar que estos animales y sus crías podrían formar parte de un núcleo familiar, donde los niños podrían ocuparse de un animal que, por lo general, es sociable y poco agresivo.

Sin embargo, la instauración del conejo como animal de compañía en el sentido actual de la palabra, es mucho más reciente. El Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española define *animal de compañía* de la siguiente manera: *dicho de un animal doméstico, aquel que se tiene por la sola utilidad de su compañía*. Se habla, por tanto, de animales distintos a aquellos que se utilizan para la producción y cuya relación con el núcleo familiar se basa exclusivamente en la compañía que proporcionan. En las sociedades occidentales, el conejo de compañía constituye una parte proporcional importante en el número total de mascotas, que se halla presente en menor número al de perros y gatos en los hogares, pero que continúa siendo el animal exótico más frecuente en las consultas veterinarias.

A pesar de que, en principio, cualquier conejo puede proporcionar compañía y mostrar un comportamiento social muy similar, las razas que habitualmente se utilizan con este objetivo son las ligeras, cuyo peso adulto no supera los 3 Kg, y las pequeñas o enanas, cuyo peso adulto es de aproximadamente 1 Kg (Rosell, 2000). Algunas de las razas que se encuentran de forma más habitual en la práctica clínica son Belier, Holandés, Angora o Mini Rex (Verhoeff-Verhallen, 2002). Estos animales, muy atractivos debido a su pequeño tamaño y su pelaje, ocupan muy poco espacio en los hogares y son de manejo sencillo, lo que determina su elección frente a otras especies como perros o gatos. Debido a sus características, así como a su cómodo mantenimiento en las casas, es presumible que en el futuro el conejo afiance su posición como una de las especies preferidas como animal de compañía.

1.7 Conclusiones

El conejo ha formado parte de las sociedades humanas desde la Prehistoria. Su carne ha sido apreciada durante siglos, y su piel es uno de los elementos estéticos preferidos en la moda. Sus características fisiológicas y comportamentales favorecen su producción y su manejo, y su empleo en los laboratorios es esencial en biomedicina. Mientras todas estas aptitudes del conejo continúan vigentes, la diversidad racial que presenta lo ha posicionado, además, entre los animales de compañía favoritos en las sociedades occidentales. Este animal, naturalmente adaptable, ha sido capaz de sobreponerse a glaciaciones, depredadores y

epidemias, extendiendo su territorio por todo el Planeta. Es posible que su adaptabilidad sea el motivo que lo hace fundamental para el mantenimiento del equilibrio ecológico. Por ello, es crucial evitar la desaparición de esta especie que, a pesar de ser responsable de múltiples plagas descritas a lo largo de la Historia, en la actualidad y en la Península Ibérica, en la que se originó la población actual, se encuentra en riesgo de desaparición.

2. PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL CONEJO

2.1 Importancia de las enfermedades infecciosas del conejo

Las enfermedades infecciosas que afectan a los conejos se producen debido a a gran diversidad de patógenos. Algunas de ellas son más frecuentes en animales silvestres, mientras que otras son típicas de conejos de aptitud cárnica o peletera (Rosell, 2000). Es importante, por tanto, conocer las diferentes afecciones y cómo pueden afectar a las distintas poblaciones de conejos. La gravedad de una infección depende de múltiples factores, como la patogenicidad del microorganismo, la resistencia individual, el estatus sanitario de la población y los factores medioambientales. Resulta especialmente importante mantener un estatus sanitario homogéneo para minimizar la circulación de patógenos, protegiendo por tanto a los individuos más susceptibles. Por otro lado, las condiciones medioambientales constituyen un elemento fundamental en el mantenimiento de la salud de los animales. Las alteraciones ambientales (cambios de temperatura, humedad elevada, corrientes de aire), problemas de manejo (alimentación, higiene deficiente, elevada densidad de animales) y otras fuentes de estrés, pueden influir negativamente en la inmunidad de los animales.

Un factor a considerar al tratar las enfermedades infecciosas de los conejos, es el hecho de que muchas de ellas constituyen zoonosis potenciales. Por lo tanto, las razones para llevar a cabo un control exhaustivo de estas infecciones no se limita a asegurar el bienestar animal y el equilibrio económico de la explotación, sino a limitar el riesgo sanitario para las personas que trabajan en contacto con estos animales (ganaderos, veterinarios, cazadores, técnicos en la cadena de producción), o van a consumir su carne. (Rosell, 2000)

Las enfermedades que mayor mortalidad producen en conejos de granja son las infecciones respiratorias, constituyendo alrededor de dos terceras partes del total de bajas, tanto en machos como en hembras; la segunda causa de mortalidad que se ha descrito son las enfermedades digestivas (Rosell, 2016). En ambos casos se trata de patologías con implicación bacteriana, muy transmisibles y que pueden provocar grandes pérdidas en las

explotaciones. En cuanto al conejo silvestre, a pesar de la incidencia de todo tipo de infecciones parasitarias y bacterianas derivadas de la falta de control sanitario, sin duda la mayor causa de mortalidad, exceptuando la predación, son las enfermedades víricas. Tanto la mixomatosis como la enfermedad vírica hemorrágica han afectado al conejo durante décadas, diezmando las poblaciones silvestres y arruinando las explotaciones en las que aparecían los brotes. Debido a la importancia que tienen las enfermedades infecciosas en el conejo, a continuación se reseñan brevemente algunas de las patologías más frecuentes, clasificadas en relación al tipo de agente etiológico responsable de la infección.

2.2 Enfermedades infecciosas de origen bacteriano

Las infecciones de origen bacteriano tienen especial importancia en las poblaciones cunícolas, debido a la facilidad de transmisión y multiplicación de estos agentes patógenos. Estos microorganismos colonizan de forma especialmente sencilla a los individuos que presentan deficiencias inmunitarias, ya sean derivadas de un mal manejo, de condiciones fisiológicas especiales (lactancia, gestación) o de la presencia de enfermedades concomitantes. Por este motivo, es especialmente importante el mantenimiento de una buena inmunidad de grupo, que proteja a la población frente a la entrada de agentes patógenos, así como la implantación de medidas higiénicas exhaustivas (VVAA, 2008).

2.2.1 Tularemia

La tularemia es una enfermedad infecciosa causada por el cocobacilo *Francisella tularensis*. Esta enfermedad, también conocida como “fiebre del conejo” o “enfermedad de Francis”, entre otras denominaciones, se describió por primera vez en 1911 en California (MSSSI, 2013; Suckow, 2012; OIE, 2016). El agente etiológico de la enfermedad, denominado en origen *Bacterium tularense*, fue aislado por primera vez en 1912 por George McCoy y Charles Chapin (Carvalho, 2014). El primer caso en humanos fue descrito en 1914 y posteriormente fue asociado al contacto con conejos. En 1919, Edward Francis, de cuyo nombre deriva el término actual por el que se conoce la bacteria, fue capaz de describir la transmisión del microorganismo a partir de artrópodos (Carvalho, 2014; Suckow, 2012). *Francisella tularensis* cuenta con dos biovars (*tularensis* y *palaeartica*) y 4 subespecies (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* y *novicida*). El microorganismo se transmite por contacto directo, vía oronasal (aerosoles), conjuntival, a través de mucosas y heridas. Además se ha demostrado su transmisión a través del consumo de agua y carne contaminada (MSSSI, 2013; OIE, 2016). Sin embargo, el método más importante de transmisión de la enfermedad es la

picadura de artrópodos e insectos hematófagos. Respecto al ciclo de transmisión, se ha determinado que puede ser de tipo fundamentalmente terrestre o acuático, en relación a los organismos implicados y a su localización. El ciclo terrestre, denominado Tipo A es el que implica a *F.t.tularensis* y en él participan garrapatas y moscas como vectores, y lagomorfos como hospedador vertebrado. El ciclo acuático, o de Tipo B lo realiza *F.t.holarctica* y en él están implicados garrapatas y mosquitos como vectores, y roedores como hospedador vertebrado (Carvalho, 2014). La bacteria presenta un amplio rango de hospedadores que es, además, muy variado. Se ha aislado a partir de más de 200 especies de artrópodos, aves, reptiles, peces y mamíferos (Suckow, 2012; Carvalho, 2014). En los conejos afectados, la enfermedad produce ataxia, anorexia y depresión, que conduce a una muerte súbita con grave afectación del hígado y bazo. Habitualmente, el diagnóstico de la enfermedad se produce *post-mortem* y no es posible instaurar un tratamiento; en los casos en que sea posible, el tratamiento de elección es de tipo antibiótico (Suckow, 2012).

La importancia de esta enfermedad radica en su carácter zoonótico (MSSSI, 2013). Se ha determinado que cantidades de 10 a 50 microorganismos son capaces de producir la enfermedad en humanos, cuyo contagio suele ser por contacto directo con animales, consumo de carne o picadura (Hill, 2011; MSSSI, 2013; OIE, 2016). La transmisión por contacto directo entre humanos no se ha descrito (WHO, 2007). En la actualidad está considerada una enfermedad emergente, cuya incidencia se ha descrito fundamentalmente en el Hemisferio Norte. Actualmente está incluida en el Plan Nacional de Vigilancia de animales Silvestres, junto con la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica (MAPAMA, 2017).

2.2.2 Principales infecciones bacterianas respiratorias

Las infecciones bacterianas que más pérdidas producen a nivel de explotación, debido tanto a mortalidad como a retrasos en el crecimiento, son las que afectan al tracto respiratorio (Rosell, 2016). Es necesario destacar las pastereosis, producidas por *Pasteurella spp.*, como el principal complejo respiratorio que afecta al conejo. Este tipo de enfermedades pueden afectar al tracto respiratorio superior, produciendo rinitis o coriza, o bien al tracto respiratorio inferior (*Pasteurella multocida*). La bacteria coloniza el tracto superior, provocando una enfermedad aguda que cursa con inflamación de los tejidos y producción de secreciones respiratorias y oculares. Cuando estos cuadros se cronifican, suelen provocar neumonía e inflamación de la pleura y el pericardio, que dificultan gravemente la respiración. Los cuadros agudos pueden reaparecer en presencia de sintomatología de tipo crónico, agravando el

proceso. El tratamiento antibiótico durante algunas semanas es eficaz en la eliminación de la infección (Poissonnet, 2004; Lennox, 2009; VVAA, 2008).

Las infecciones por *Bordetella spp.*, son menos habituales que las pastereosis, y afectan con mayor frecuencia a los animales más jóvenes (Johnson, 2011). *B. bronchiseptica* es una bacteria comensal en el sistema respiratorio del conejo y se encuentra de forma habitual asociado a las infecciones por *P. multocida*. Los signos clínicos más frecuentes son estornudos, descarga nasal y dificultad respiratoria, aunque su presencia puede cursar sin síntomas (Johnson, 2011). Se ha sugerido la existencia de cepas especialmente patógenas se ha sugerido, así como la presencia de factores predisponentes (Lennox, 2009). Otros agentes patógenos que afectan al sistema respiratorio del conejo con menor frecuencia, son *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.*, en el tracto superior, y *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto inferior (Lennox, 2009).

Como se ha explicado, la concurrencia de varios agentes en una infección respiratoria es habitual. La importancia de las infecciones mixtas radica en la mayor gravedad con que pueden cursar, debido a la severidad de las lesiones tisulares producidas, lo que incrementaría como resultado las tasas de mortalidad. Asimismo, en animales debilitados es frecuente la colonización del sistema respiratorio por bacterias oportunistas, que constituyen un riesgo de empeoramiento del cuadro clínico.

2.2.3 Principales infecciones bacterianas digestivas

Las enfermedades digestivas son causantes de importantes pérdidas económicas en las explotaciones, ya que retrasan el crecimiento de los animales y su venta, alargando además el tiempo de permanencia en la explotación, con los gastos derivados de su alimentación y tratamiento (Fig. 2). Al igual que las enfermedades respiratorias, las infecciones digestivas son fácilmente transmisibles entre animales, por lo que su control debe ser exhaustivo (Gracia, 2004; Vázquez, 2006; Mateo, 2000; Suckow, 2012). Una de las enfermedades digestivas más frecuentes es la enterotoxemia. Esta enfermedad está producida por clostridios productores de potentes toxinas, como *Clostridium perfringens* y *Clostridium spiriforme* (Halls, 2017). El sobrecrecimiento de estas bacterias produce un cuadro de diarrea acuosa, anorexia y apatía, que suele provocar la muerte en 24-48 horas debido a la deshidratación, el desequilibrio electrolítico y la toxemia. Esta enfermedad es más frecuente en animales recién destetados y su tratamiento es difícil, por lo que se trata de controlar su prevalencia a través de una dieta rica en fibra (Halls, 2017; Suckow, 2012; VVAA, 2008). La enfermedad de

Tyzzer está producida por *C. piliforme* (*Bacillus piliformis*) y es causante de una diarrea profusa que puede producir la muerte de los gazapos en 12-72 horas, debido a la deshidratación. Los factores productores de estrés, las enfermedades secundarias, las alteraciones en la inmunidad y la alimentación escasa en fibra, se relacionan directamente con su aparición. La presencia de especies portadoras (roedores, gatos) en contacto con los animales es un factor de riesgo que puede incrementar la incidencia de esta enfermedad (Halls, 2017).

La colibacilosis es una patología digestiva frecuente en conejos jóvenes, producida por cepas enteropatógenas de *E. coli*. La infección cursa con diarrea, pérdida de peso, deshidratación y elevada mortalidad. La aparición de esta enfermedad se relaciona con la transmisión a través de la madre, así como con factores estresantes, alimentación pobre en fibra y enfermedades concomitantes (Halls, 2017; Suckow, 2012; VVAA, 2009). La enteritis mucoide también es un complejo digestivo de relevancia (Pérez, 2005; Brana, 2008; VVAA, 2008). Esta patología produce diarreas mucosas de aspecto muy característico y de etiología incierta, si bien se ha asociado con disbiosis subyacentes y alteraciones de pH a nivel intestinal. La antibioterapia preventiva ha sido, tradicionalmente, el método profiláctico de elección. Otros patógenos de interés que afectan al aparato digestivo son *Enterobacter spp.*, *Campylobacter spp.* y *Lawsonia intracellularis*, agente etiológico de la enteritis proliferativa (Suckow, 2012; Lennox, 2009). Los brotes de salmonelosis (*Salmonella spp.*) son poco frecuentes y pueden producir cuadros digestivos de carácter inespecífico (diarrea acompañada de fiebre, apatía y anorexia severas), aunque lo más frecuente es que la sobreinfección con *Salmonella spp.* desemboque en un cuadro septicémico.



Figura 2. Diarreas en conejos (A, B). La presencia de restos fecales en la región perineal es un signo clínico indicativo de esta patología en el conejo.

2.2.4 Principales infecciones bacterianas de la piel

A pesar de ser una patología cada vez menos frecuente en los sistemas de explotación actuales, es necesario reseñar la pododermatitis ulcerativa, también denominada “mal de patas” (Poissonnet, 2004; VVAA, 2008). Se trata de una afección cutánea de las extremidades posteriores, que ocurre tanto en animales de producción como domésticos. La enfermedad se produce cuando los animales, especialmente obesos o de razas pesadas, apoyan sus patas posteriores sobre superficies irregulares o cortantes, como jaulas mal acondicionadas, donde el animal reposa sobre alambres de pequeño diámetro, que marcan la piel hasta cortarla. Debido a la infección de estas heridas con *Staphylococcus aureus*, se producen graves lesiones supurativas en los animales. Además de *S. aureus*, es frecuente la colonización de las heridas por *Fusobacterium necrophorum*, cuya presencia agrava considerablemente el cuadro clínico, así como la coinfección por otros patógenos oportunistas (Poissonnet, 2004; VVAA, 2008).

En el caso de esta enfermedad, las pérdidas económicas también se producen por el retraso en el crecimiento de los animales, que se muestran apáticos y anoréxicos y pueden presentar cuadros febriles, dependiendo de la gravedad de las lesiones. En la actualidad, mediante la aplicación de medidas higiosanitarias estrictas y el control de la cantidad de animales por jaula, esta patología ha disminuido notablemente su presencia en las explotaciones (Rosell, 2000).

2.3 Enfermedades parasitarias

Las enfermedades parasitarias en el conejo se encuentran bastante controladas a nivel industrial debido a la aplicación sistemática de antiparasitarios en los animales, y al control de insectos y artrópodos que se lleva a cabo. No obstante, es frecuente encontrar en las explotaciones infecciones parasitarias recurrentes, por lo que extremar las medidas de control es esencial.

2.3.1 Parasitosis internas

Las enfermedades parasitarias en el conejo se deben fundamentalmente a la infección por protozoos. Existen varios tipos de protozoos que afectan a esta especie; algunos de ellos son especialmente frecuentes (*Eimeria spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Sarcocystis spp.*) y otros se encuentran en menor medida en las poblaciones (*Encephalitozoon cuniculi*).

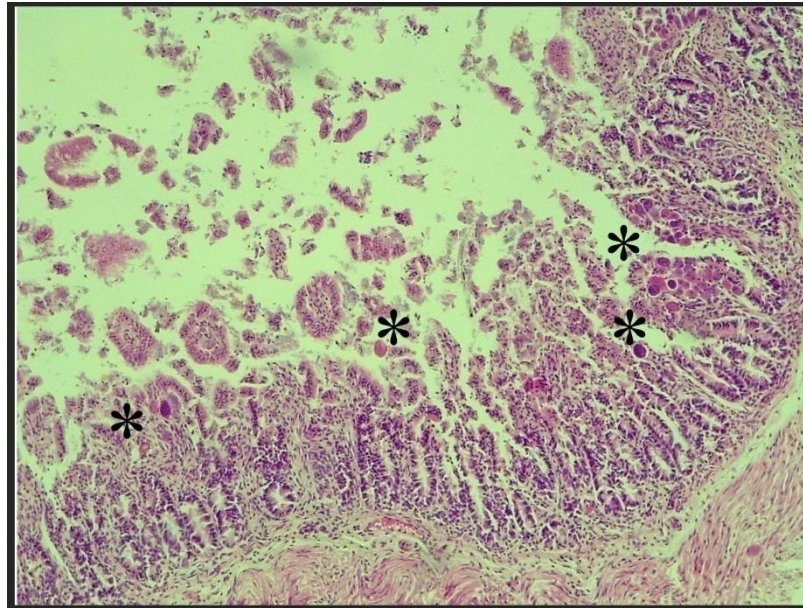


Figura 3. Coccidiosis en intestino de conejo (Tinción H/E). Se observan formas parasitarias en diferentes fases (asterisco) a lo largo del epitelio intestinal

El protozoo más importante en el conejo, debido a su frecuencia de presentación y facilidad de transmisión, es *Eimeria spp.* (Fig. 3, 4). Este parásito se transmite por vía fecal-oral y se disemina con gran facilidad entre los animales, ya sea por contacto directo o por fomites. Tras la entrada al organismo por vía oral, el parásito invade diferentes tramos del intestino, donde produce las lesiones antes de salir al medio ambiente con las heces, completando su ciclo. Existen varias especies de *Eimeria spp.* que afectan al conejo, y habitualmente son responsables de cuadros digestivos multiespecíficos que causan emaciación en los animales (Tabla I). Cabe destacar *Eimeria stiedai*, por ser el agente etiológico de la coccidiosis hepática. Esta enfermedad afecta al hígado y conductos biliares de los animales y muestra una imagen hepática muy característica.

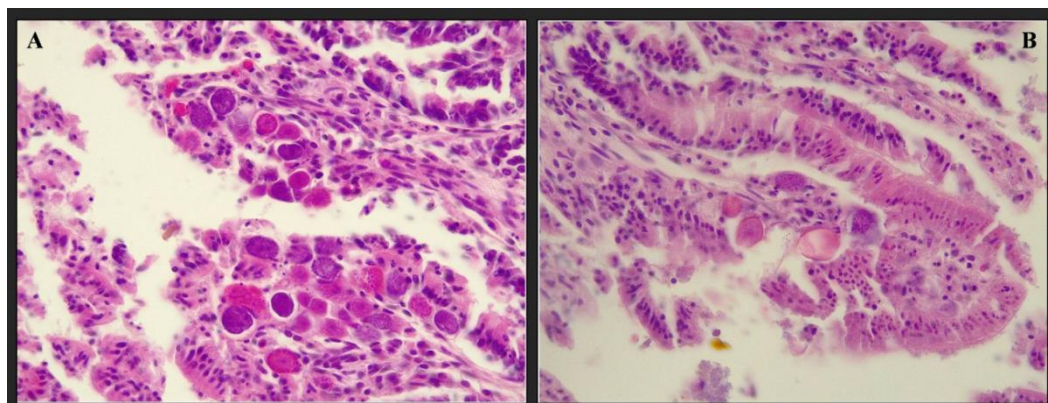


Figura 4. Coccidiosis en intestino de conejo (Tinción H/E). Se observan lesiones en el epitelio intestinal y diferentes fases parasitarias (A, B)










Los nematodos que infectan con más frecuencia al conejo pertenecen a los géneros *Passalurus*, *Dirofilaria*, *Trichuris* y *Protostrongylus*, aunque también es frecuente la infección con ascáridos. El parásito más destacable de este grupo, por su frecuencia de presentación, es *Passalurus ambiguus*, aunque en la actualidad los nematodos son parásitos poco frecuentes en las explotaciones debido a la desparasitación sistemática. Por este mismo motivo, los cestodos y trematodos se encuentran de forma poco habitual en las producciones industriales de conejos. No obstante, es necesario destacar la importancia de *Taenia spp.* y *Fasciola hepática*, por su potencial zoonótico (Anexo 2; Vázquez, 2006).

2.3.2 Parasitosis externas

Existen dos motivos por los que es importante reseñar los parásitos externos que pueden causar problemas sanitarios tanto en las explotaciones cunícolas como en el conejo silvestre y de compañía. En primer lugar, estos parásitos pueden provocar lesiones derivadas del desarrollo de sus actividades vitales sobre la piel o el pelo. En segundo lugar, algunos de estos ectoparásitos actúan como vectores, transmitiendo otras enfermedades infecciosas como la tularemia o la enfermedad hemorrágica. Por ambos motivos, es esencial llevar a cabo un buen control de vectores en las explotaciones y una desparasitación intensiva de los animales. Los parásitos externos más comunes en el conejo son los ácaros, como *Sarcoptes (S. scabiei)*, *Psoroptes (P. cuniculi)*, *Notoedres (N. cati)*, *Otodectes (O. cynotis)*, *Cheyletiella (Ch. parasitovorax)* y *Demodex (D. folliculorum, D. cuniculi)*. Estos agentes producen importantes lesiones en la piel del animal, prurito y predisposición a infecciones bacterianas secundarias. En este mismo grupo se engloban las garrapatas, tanto pertenecientes a la Familia Argasidae (*Otobius lagophilus*), como Ixodidae (*Haemaphysalis leporispalustris*). Estos artrópodos hematófagos producen lesiones cutáneas en los animales y constituyen uno de los vectores más importantes de transmisión de enfermedades.

En cuanto a los insectos, el conejo está afectado fundamentalmente por pulgas (*Pulex irritans*, *Spilopsyllus cuniculi*, *Xenopsylla cunicularis*, *Ctenocephalides canis*, *Echidnophaga iberica*, *E. gallinácea*), piojos (*Haemodipsus ventricosus*, *Gliricola porcelli*) y mosquitos (*Aedes spp.*, *Anopheles spp.*), todos ellos insectos hematófagos y vectores potenciales. Es importante tener en cuenta que algunos de estos parásitos son también zoonóticos, por lo que su control resulta imprescindible en las explotaciones. (Anexo 2; Suckow, 2012; Poissonnet, 2004; Meredith, 2013)

Tabla I. Especies de Eimeria que afectan al conejo (adaptado de Cordero del Campillo, 1999)

ESPECIE	LOCALIZACIÓN	PREVALENCIA	PATOGENICIDAD	LESIONES	OOQUISTES
<i>E. coecicola</i>	Íleon (esquizogonia) Ciego (gamogonia)	+++	No patógena	Hipertermia, depósitos blanco- grisáceos en la válvula íleo-cecal	
<i>E. perforans</i>	Yeyuno	++++	Poco patógena	Escasas	
<i>E. intestinalis</i>	Yeyuno- Íleon Intestino grueso (gamogonia)	+	Muy patógena	Nódulos color gris- blanquecino en íleon y válvula íleo- cecal	
<i>E. flavescens</i>	Íleon (1ª esquizogonia) Ciego-colon	++	Muy patógena	Engrosamiento de la mucosa, petequias en colon y ciego	
<i>E. stiedai</i>	Conductos biliares	++	Muy patógena	Nódulos blanquecinos en superficie hepática, dilatación de los conductos biliares	
<i>E. magna</i>	Yeyuno Íleon	++++	Patógena	Nódulos pequeños de coloración blanquecina en la pared del intestino delgado	
<i>E. irresidua</i>	Íleon	++	Patógena	Engrosamiento de la mucosa, hipertermia, contenido rosado en el intestino delgado	
<i>E. media</i>	Duodeno Yeyuno	++++	Patógena	Nódulos color gris- blanquecino en la mucosa, hipertermia, petequias en intestino	
<i>E. piriformis</i>	Ciego Colon-recto	+	Patógena	Enteritis catarral, nódulos en íleon	

2.4 Enfermedades infecciosas de origen fúngico

Las infecciones fúngicas que más frecuentemente se observan en los conejos son las dermatofitosis. Se trata de infecciones producidas por hongos del género *Trychophyton* , principalmente *T. mentagrophytes*, y del Género *Microsporum*, fundamentalmente *M. canis*. Ambos agentes afectan la piel de los animales y el hombre, causando lesiones urticantes, descamativas y alopecicas, que tienden a colonizar otras áreas cutáneas con facilidad. Se trata de infecciones de escasa importancia en condiciones normales, aunque pueden agravarse en animales débiles o inmunodeprimidos, especialmente si se complican con infecciones bacterianas secundarias. En la actualidad, las dermatofitosis se encuentran bastante controladas debido al manejo higiosanitario de las explotaciones (Rosell, 2000; Suckow, 2012), aunque aun se consideran un problema importante en pequeñas explotaciones o en regiones socialmente deprimidas. Ambas infecciones constituyen zoonosis potenciales, por lo que el manejo de animales sospechosos de padecerlas debe realizarse con cautela y manteniendo medidas higiénicas apropiadas..

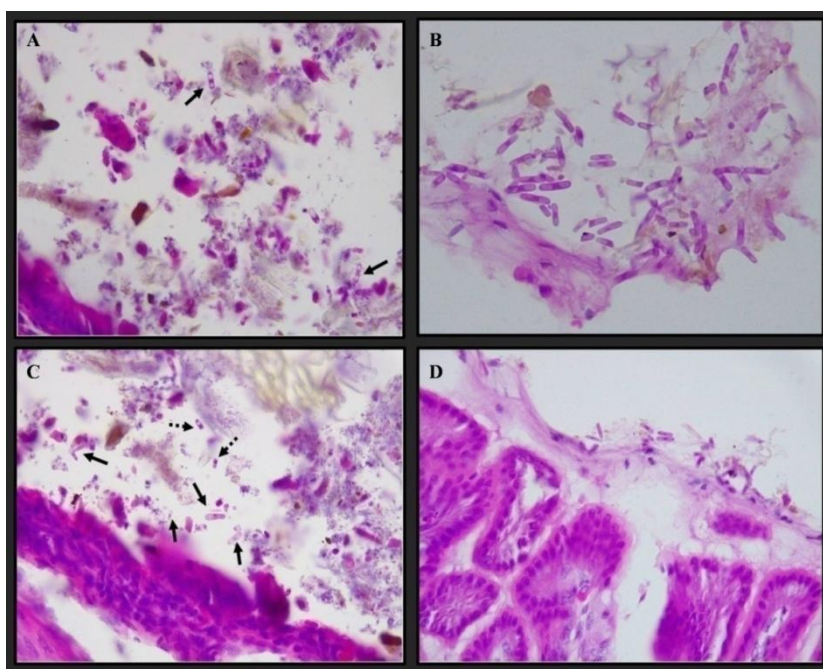


Figura 5. Corte histológico de intestino de conejo (H/E). Presencia de abundante moco y *Cyniclomyces guttulatus* en contenido intestinal. Microorganismos completos (flechas sólidas) e incompletos (flechas con línea de puntos)

En el caso de animales especialmente susceptibles, se han descrito cuadros patológicos asociados a levaduras consideradas de tipo comensal, tanto asociados a *Candida spp.*, como a infestaciones masivas por *Cyniclomyces guttulatus* (Fig. 5). Asimismo, se han descrito casos

de micosis internas debidas a *Aspergillus spp.*, principalmente en animales con especial vulnerabilidad a las infecciones

2.5 Enfermedades infecciosas de origen vírico

Las enfermedades víricas más importantes en el conejo son la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica. En la actualidad, la aparición de brotes se ha reducido considerablemente debido a la vacunación sistemática frente a ambas patologías y, exceptuando la variante *b* de la enfermedad hemorrágica, que aun se halla en una situación delicada, estas enfermedades se encuentran bastante controladas desde el punto de vista sanitario.

2.5.1 Mixomatosis

La mixomatosis es una enfermedad infecciosa de origen vírico, producida por virus de la Familia Poxviridae, Género Leporipoxvirus (Murphy, 1999; Alda, 2009). Los poxvirus son patógenos caracterizados por provocar infecciones agudas y de tipo persistente (Standford, 2007). El virus que causa la mixomatosis se denomina comúnmente “virus mixoma” y se han descrito varias cepas del virus con diferentes grados de virulencia (Fenner, 1957) según la velocidad de instauración de la enfermedad y la mortalidad que producen (Tabla II). La mixomatosis fue descrita por primera vez en Uruguay por Giuseppe Sanarelli (1898) en *S. floridanus* (Fenner, 1965; Spiesschaert, 2011; Alda, 2008; Rosell, 2000; Suckow, 2012). Una década más tarde, en 1911, se aisló en Brasil la cepa que se denominaría SLS (Standard Laboratory Strain) (Standford, 2007), que se comenzó a investigar de forma exhaustiva desde entonces. En los años 20 el virus se llevó a Australia para su estudio como arma biológica frente a la plaga de conejos y, tras varios intentos fallidos, en 1950 esta cepa laboratorial del virus se liberó, utilizando conejos infectados, como medio de control de plagas (Rosell, 2000; Suckow, 2012). Debido a esta medida, la población cunícola de la isla disminuyó un 95% en los siguientes 5 años (Williams, 1995; Fenner, 1999; Alda, 2008).

De forma paralela, en 1952 en Europa, Armand Delille infectó conejos silvestres con la cepa Lausanne y los liberó en Francia con el objetivo de proteger los cultivos (Rosell, 2000). Esta cepa alcanzó la Península Ibérica en 1953 y en menos de un año la entonces llamada “peste de los conejos” se había extendido por gran parte de Europa, alcanzando Italia, Alemania, Bélgica, Holanda, Luxemburgo, y las Islas Británicas (Suckow, 2012; Alda, 2008; Muñoz, 1960; Rosell, 2000). El virus produjo tasas de mortalidad de hasta el 90% (Fenner,

1957; Bárcena, 2000; Alda, 2008) mermando las poblaciones en un 50% en Francia y un 80% en España (Fenner, 1999; Alda, 2008). A pesar del control sanitario que se ha llevado a cabo durante las últimas décadas, en la actualidad, la enfermedad es endémica en América, Europa y Australia. Se trata además de una enfermedad de declaración obligatoria, cuya vigilancia, tanto pasiva como activa, es fundamental para evitar su propagación (MAPAMA, 2014; MAPAMA, 2015).

Tabla II. Grados de virulencia establecidos para el virus mixoma⁷

GRADO	% MORTALIDAD	GRADO DE VIRULENCIA	DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD	CEPA TIPO
I	99,5	Muy elevada	< 13 días	<i>SLS</i> (Australia) <i>Lausanne</i> (Europa)
II	99	Elevada	13-16 días	-
III	90	Moderada	16-28 días	<i>KM13</i> (Australia)
IV	60-70	Baja	28-50 días	<i>Uriarra</i> (Australia) <i>Loiret 55</i> (Europa)
V	0-30	Muy baja	-	<i>Neuromixoma</i> (Australia) <i>Nottingham atenuada</i> (Europa)

⁷ Adaptado de Fenner y Marshall (1957)

El hospedador natural del virus es el conejo del Género *Sylvilagus*, que habita tanto en América del Sur (*S. floridanus*, *S. brasiliensis*), como en la costa oeste de Norteamérica (*S. bachmani*). En estas especies se produce la forma benigna de la infección, cuyo signo clínico es la producción de fibromas en el lugar de picadura del vector (Meredith, 2013; Rosell, 2000). Una particularidad del virus mixoma es haber sido capaz de colonizar una nueva especie y provocar enfermedad. La posibilidad de infectar con éxito a *O. cuniculus* y adaptarse a este nuevo hospedador, es un ejemplo clásico de “salto de especie” (Pinheiro, 2015). La liebre se considera un hospedador poco frecuente de este virus, aunque se ha descrito la enfermedad en *Lepus europaeus* y *Lepus timidus* (Fenner, 1965; Suckow, 2012; OIE, 2014). La enfermedad se transmite por contacto directo entre animales infectados, a partir de las lesiones cutáneas o mixomas, de secreciones oculares, nasales y genitales, incluyendo y de fómites (Kerr, 2013; Pinheiro, 2015); además se puede transmitir de madres infectadas a sus crías, así como de gazapos infectados a hembras adoptivas (Rosell, 2000). La transmisión a partir de vectores resulta de gran importancia en la propagación de la enfermedad a distancia y le confiere un carácter estacional. La picadura suele aparecer en zonas cutáneas hipopigmentadas o sin pelo y el virus alcanza los macrófagos y las células dendríticas de la dermis, desde donde se disemina a la epidermis. Desde ésta se distribuye hacia los linfonódulos regionales, donde se puede encontrar 24 horas post-infección, y se replica en linfocitos y macrófagos. Desde estos linfonódulos, el virus se distribuye a los tejidos distales del organismo (otros linfonódulos, bazo, hígado, pulmón, mucosas, piel, testículos), donde se replica causando lesiones secundarias (Best, 2000; Kerr, 2013; Pinheiro, 2015). Este virus es, además, capaz de evadir la respuesta inmune mediante unos 70 factores codificados en su ADN.

Se han descrito dos formas clínicas de la enfermedad: la forma clásica o nodular, se caracteriza por la producción de tumores o mixomas que suelen aparecer en las primeras 72 horas tras la inoculación y que se diseminan por el resto del organismo unos 6 días post-infección desde el punto de inoculación a la cara, especialmente la región ocular, las orejas y la región perineal. Posteriormente se pueden observar lesiones en el resto del cuerpo, incluyendo las extremidades inflamación palpebral que tiene lugar, y que se acompaña de conjuntivitis y descarga ocular mucopurulenta. La blefaroconjuntivitis se acompaña de signos respiratorios, disminución de la condición corporal de los animales, inflamación de linfonódulos y fiebre que puede superar los 40°C (Rosell, 2000; Meredith, 2013; Kerr, 2015; Pinheiro, 2015). Su presentación clínica puede ser hiperaguda, aguda o subaguda. En segundo

lugar, la forma atípica o amixomatósica, se describió por primera vez alrededor de 1980 y cursa de forma respiratoria. Esta forma clínica requiere del contacto directo para su transmisión (Rosell, 2000; Marlier, 2000; OIE, 2014).

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar de forma presuntiva in vivo o post-mortem, mediante observación de las lesiones, exclusivamente en la forma clásica de la enfermedad. El diagnóstico laboratorial permite el aislamiento del virus, la detección del agente etiológico o sus ácidos nucleicos, y el estudio serológico de la presencia de anticuerpos en los animales. El estudio histopatológico de las lesiones también permite detectar alteraciones indicativas de la infección por el virus. La profilaxis sanitaria se lleva a cabo mediante vacunación sistemática de los animales y programas de control de vectores. En la actualidad se utilizan vacunas heterólogas que incluyen el virus del fibroma de Shope (VFS)⁸, así como vacunas homólogas fabricadas a partir de cepas atenuadas del virus mixoma vacunas. Además existe la posibilidad de aplicar vacunas bivalentes frente a la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica.

2.5.2 Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo

La enfermedad hemorrágica vírica del conejo, debido a su especial importancia y como tema central de esta Tesis Doctoral, se describirá en profundidad en el apartado 3.

3. ENFERMEDAD VÍRICA HEMORRÁGICA

3.1 Contexto histórico

La enfermedad hemorrágica del conejo fue descrita por primera vez en la provincia de Jiangsu, en China, en el año 1984 (Liu, 1984). En menos de un año, 140 millones de conejos murieron en el país debido a una enfermedad hasta entonces desconocida y que se diseminaba a gran velocidad, colonizando un área de 50000 Km² durante el primer año (Abrantes, 2012; ISU, 2007). Se cree que el origen de la epidemia fue un lote de conejos de angora importados de Alemania, y que podrían haber llegado enfermos al país (Liu, 1984; Xu, 1989), aunque la coincidencia del brote con el proceso de importación podría ser mera casualidad (Rodák, 1990). Se llegó a especular con la idea de que la causa de la epidemia fuera algún tipo de toxina, probablemente debido a los signos clínicos que se producían, aunque esta idea se desechó rápidamente al demostrarse que el causante de la enfermedad era un virus (Xu, 1991; Fenner, 1999; Alda, 2008). La teoría de que un virus característico de los lagomorfos, de baja

⁸ Leporipoxvirus

patogenicidad, hubiera podido mutar dando lugar a un nuevo virus causante de la enfermedad vírica hemorrágica, comenzó entonces a ser relevante (Rodák, 1990).

Tabla III Aparición de los primeros brotes de RHDV en diferentes países del Mundo

AÑO	APARICIÓN DE LA ENFERMEDAD	DESCRIPCIÓN
1984	CHINA	Liu, 1984; Xu, 1989; Rodak, 1990
1987	EUROPA/KOREA ²	² Lee, 1987; Parra, 1990
1988	ITALIA ³ /FRANCIA ⁴ /HUNGRÍA ¹⁷⁻³ /ESTADOS UNIDOS/MÉJICO ⁸	³ Cancelloti, 1988; Parra, 1990/ ⁴ Morisse, 1988; Parra, 1990/Matiz, 2006/ ⁸ Gregg, 1989; Gregg, 1991/ISU, 2000
1989	AUSTRIA ⁵ /ALEMANIA ⁶ /ESPAÑA ⁷	⁵ Kolbl, 1990/ ⁶ Löliger, 1989; Parra, 1990
1991	R. CHECA/R. ESLOVACA/KOREA ⁹ /ISRAEL ⁹⁻² /AUSTRALIA*	⁹ Park, 1991/Kuttin, 1991 ⁹⁻²
1992	REINO UNIDO ¹⁰ /TÚNEZ ¹²	¹⁰ Fuller, 1993/ ¹² Bouslama, 1996
1995	AUSTRALIA ¹⁴ /IRLANDA ¹¹ /ESCOCIA ¹⁴	¹¹ Graham, 1996/ ¹⁴ Le Gall, 1998
1996	POLONIA ¹³ /CHIPRE ¹⁴	¹³ Kesy, 1996
1997	NUEVA ZELANDA ¹⁵	¹⁵ Thompson, 1997; Motha, 1998
1999	ARABIA SAUDÍ ¹⁶	¹⁶ Abu, 1999
2004	PAÍSES BAJOS ¹⁷⁻² /URUGUAY ¹⁷⁻⁴ /CUBA ¹⁷⁻⁴	¹⁷⁻² van de Bildt, 2006/ ¹⁷⁻⁴ McIntosh, 2007
2012	CANADÁ ¹⁷	¹⁷ Gould, 2012

Los primeros años tras la aparición de la enfermedad fueron críticos (Tabla III). El virus se expandió rápidamente hacia Asia, alcanzando Korea a partir de piel importada de China (Oem, 2009) y a lo largo de Europa, continente que colonizó casi por completo antes de 1990 (Cancelloti, 1991; Löliger, 1991; Kolbl, 1990; Parra, 1990). En 1988 la enfermedad se

detectó también en Estados Unidos (VVAA, 2000; Matiz, 2006), donde el número de casos fue, sin embargo, muy escaso (Donnelly, 2013), y en Méjico (Gregg, 1989; Gregg, 1991), donde el último brote se notificó en 1992 (Heneidi, 1997; Abrantes, 2012). El proceso de erradicación que se llevó a cabo en Méjico fue efectivo y relativamente rápido, ya que en estas regiones las poblaciones de conejo son minoritarias, lo que facilitó el control de la epidemia. Las Islas Británicas (Fuller, 1993; Collieri, 1995; Graham, 1996; Le Gall, 1998) y algunas regiones del Norte de África (Kuttin, 1991; Bouslama, 1996) fueron colonizadas entre 1992-1995 por el RHDV, creando una situación de emergencia en la zona Mediterránea. La última región en ser alcanzada por el virus de la enfermedad vírica hemorrágica fue Canadá, donde se notificó un caso de la enfermedad en un conejo doméstico, en 2012 (Gould, 2012). La aplicación de medidas preventivas, tanto de tipo higiénico como sanitario, fue crucial en el control de la enfermedad y la frecuencia de aparición de brotes disminuyó notablemente.

La situación de equilibrio que se generó, en la que el número de brotes notificado había descendido y se manejaba de forma eficaz, se mantuvo durante la primera década del siglo XXI. Sin embargo, en 2010 se describió en Francia una nueva variante del virus, hasta entonces desconocida, que marcó un punto de inflexión en la situación global de la enfermedad (Le Gall-Reculé, 2011). El nuevo virus devolvió el protagonismo a la infección al diseminarse rápidamente en Europa. En menos de 5 años se propagó por la Península Ibérica (Dalton, 2012), Italia (Puggioni, 2013), Reino Unido (Baily, 2014; Simpson, 2014; Westcott, 2015). Poco tiempo después se detectaron los primeros casos en Australia (Hall, 2015). Actualmente, la enfermedad es endémica en Europa, Asia y América (Dalton, 2017), con graves repercusiones tanto económicas como ecológicas a nivel global.

Uno de los aspectos más controvertidos en relación a esta enfermedad es su situación en Oceanía⁹. Puesto que la introducción del virus de la mixomatosis a principios del siglo XX había sido incapaz de exterminar la población de conejos de la isla, en 1991 se consideró utilizar el virus de la enfermedad hemorrágica para controlar esta plaga (Kovaliski 1998; Abrantes, 2012). En 1995 el virus comenzó a testarse a nivel de campo en la isla de Wardang, que se mantuvo en cuarentena durante estos experimentos. Sin embargo, el virus escapó las medidas de control, posiblemente debido al viento, la presencia de vectores y el movimiento de aves carroñeras, que probablemente interaccionaron con los cadáveres diseminados en la

⁹ El conejo no es un animal originario del continente y no existió en las islas hasta que, a mediados del siglo XIX, los viajeros que colonizaron la zona, llevaron pequeñas poblaciones de conejos (Kovaliski, 2013). Entre 1930-1960 estas poblaciones se diseminaron creando una plaga que puso en peligro el ecosistema australiano. El primer intento para controlar esta población fue sugerido por Louis Pasteur, quien propuso infectar los animales con *Pasteurella spp.* con el objetivo de disminuir el número de animales. Sin embargo, esta sugerencia fue denegada y en 1936 se propuso la utilización del virus de la mixomatosis, que resultó eficaz durante unas décadas (Spiesschaert, 2011).

isla (Mutze, 1998). Desde esta región situada al Sur de Australia, el virus alcanzó tierra firme y dos semanas más tarde se notificaron dos brotes a 300 Km de distancia hacia el Norte, separados entre sí unos 100 Km; como resultado, la población de conejos en Australia se redujo un 95% debido a la epidemia (Mutze, 1998). Meses más tarde se detectó el virus en Nueva Gales del Sur (Lugton, 1999) y en la actualidad la enfermedad se considera endémica en Australia. En 1996 se solicitó al gobierno de Nueva Zelanda el uso de este virus como medida de control de plagas en las islas. Sin embargo, tras la experiencia sufrida con la diseminación accidental del virus en Australia y sus importantes consecuencias, se denegó esta propuesta. No obstante, y a pesar de la prohibición expresa, el virus fue introducido en Nueva Zelanda de forma ilegal por agricultores y terratenientes, cuyos territorios estaban amenazados por la plaga de conejos (Thompson, 1997; Sanson 2000; O'Hara, 2006). El resultado fue la diseminación de la enfermedad en las islas neozelandesas que, actualmente, mantienen la infección de forma endémica.

3.2 Etiología

El agente etiológico de la enfermedad es un Calicivirus perteneciente al Género Lagovirus (Parra, 1990). Durante los primeros años de estudio de este virus, existió una cierta incertidumbre sobre su clasificación taxonómica. La morfología del virus, así como la controversia existente sobre el tipo de material genético que contenía (Rodák, 1990; Du, 1991) complicaron su asignación a un grupo taxonómico. Mientras algunos estudios sostenían que se trataba de un Picornavirus (Xu, 1989; Pu, 1985) y otros lo clasificaban como Parvovirus o “*Parvo-like virus*¹⁰” (Xu, 1991), un tercer grupo de autores lo identificó como Calicivirus (Plana, 1989; Smid, 1989; Parra, 1990; Rodák, 1990; Valicek, 1990; Ohlinger, 1991; Seal, 1994), familia en la que actualmente se incluye. Inicialmente se propuso el nombre “calicivirus del conejo” para designar a este virus (Parra, 1990), aunque más adelante se denominó “virus de la enfermedad hemorrágica del conejo”, nombre con el que se le conoce en la actualidad.

3.2.1 Los calicivirus

La familia de los calicivirus (Caliciviridae, 1979), toma su nombre del término latino *Calix*, que significa *cáliz* o *copa*, y hace referencia a las depresiones con esta forma que muestran en su superficie algunos calicivirus (Thiel, 1999; Green, 2000). Se trata de virus sin envoltura lipídica, cuya cápside les confiere simetría icosaédrica. Esta cápside está formada

¹⁰ Virus similar a un Parvovirus

por 90 dímeros de una proteína estructural denominada VP60. Este tipo de conformación, formada por una sola proteína, es habitual en virus de plantas, pero muy poco común en los virus animales (Thiel, 1999; Nagesha, 1999; Rohayem, 2010; Almanza, 2011; Murphy, 1999). En el interior de la cápside se encuentra el material genético del virus, ARN monocatenario de polaridad positiva, de 7,4-8,3 Kb. Tanto el ARN genómico (ARNg) como el subgenómico (ARNsg) se encuentran poliadenilados en el extremo 3' y unidos covalentemente a una proteína denominada VPg¹¹, en su extremo 5' (Thiel, 1999; Almanza, 2011; , 1999). El ARNg del virus se encuentra organizado en 2-3 ORFs¹², dependiendo del género al que pertenezca. Esta familia agrupa virus que infectan fundamentalmente a mamíferos terrestres y acuáticos, que se encuentran incluidos en los siguientes géneros (Neill, 1992; Green, 2000; Royahem, 2010; Almanza, 2011):

- Norovirus¹³: se trata de virus humanos, bovinos, porcinos, murinos, caninos y felinos. Existe una distinción taxonómica entre NV- humanos y NV-no humanos (Ando, 2000; Zheng, 2006)
- Sapovirus¹⁴: estos virus infectan humanos, porcino y mustélidos. Al igual que ocurre con los NV, se distingue entre patógenos humanos y no humanos
- Vesivirus¹⁵: incluye virus felinos, caninos, bovinos, porcinos, así como de cetáceos, primates, conejos, mofetas, reptiles, anfibios, peces y nematodos (Burroughs, 1978)
- Lagovirus¹⁶: infectan exclusivamente a los lagomorfos

Los géneros de más reciente clasificación son Beco¹⁷-Nabovirus¹⁸ (bovino) y Recovirus¹⁹ (mono Rhesus). A pesar de las estrechas relaciones taxonómicas entre especies infectivas para humanos y animales, no existe evidencia de zoonosis producidas por virus de esta familia (Carman, 1998; Rohayem, 2010).

¹¹ Por sus siglas en inglés: *Virion Protein, genome linked* (proteína del virión, unida al genoma)

¹² Por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame* (marco de lectura abierta)

¹³ *Norwalk-like viruses* (Zheng, 2006)

¹⁴ Virus tipo: Sapporo virus

¹⁵ Virus tipo: Vesicular exantema of swine virus

¹⁶ Virus tipo: Rabbit haemorrhagic disease virus

¹⁷ Virus tipo: Bovine enteric calicivirus

¹⁸ Virus tipo: Newbury agent-1 and NB

¹⁹ Virus tipo: Rhesus enteric calicivirus

3.2.2 Calicivirus del conejo: variantes no patógenas y de baja patogenicidad

3.2.2.1 RCV

El término RCV procede del inglés *Rabbit Calicivirus* y se utiliza para designar aquellos calicivirus del conejo que no presentan patogenicidad o su potencial patógeno es muy bajo. Posteriormente se han propuesto varias denominaciones para designar este grupo de virus, como *RCV-like* (Kerr, 2009) o *Lagovirus no patógenos del conejo* (Le Gall-Reculé, 2011). Sin embargo, el término RCV aun se utiliza de forma consistente.

El primer calicivirus no patógeno descrito fue aislado en Italia y se denominó RCV (Capucci, 1996). Se trataba de un virus no letal y similar al RHDV, pero que presentaba diferencias genéticas y de tropismo celular con el mismo. Cepas similares se aislaron en Irlanda (cepa Lambay) y Reino Unido (cepa Ashington), sugiriendo que los calicivirus no patógenos podrían circular de forma silenciosa en las poblaciones. Estudios serológicos locales mostraron que los animales en estas regiones contaban con títulos de anticuerpos capaces de protegerles frente a la infección por RHDV en regiones donde no se había descrito la enfermedad; este hecho sugería una posible protección cruzada entre ambos virus (Capucci, 1997; Trout, 1997; White, 2001; Forrester, 2007). De forma simultánea, en Italia, se demostraba que el RCV resultaba efectivo en la inmunización frente al RHDV (Capucci, 1998), mostrando la posibilidad de una inmunización alternativa utilizando este virus. Sin embargo, estudios posteriores han determinado que esta protección puede ser total, parcial o nula (Abrantes, 2012), justificando el hallazgo de animales con títulos protectores frente al virus, que habían muerto debido al RHDV (Marchandea, 2005; Strive, 2010).

El calicivirus no patógeno más reciente se describió en Australia y se denominó RCV-A1 (Strive, 2009). Este virus, así como el RCV aislado en Italia, presenta protección cruzada frente al RHDV, y su no letalidad ha sido demostrada. Sin embargo, los aislados restantes, que han sido aislados de animales sanos y en ausencia de brotes de enfermedad, presentan una no patogenicidad asumida. En el caso de la cepa Ashington, se presupone cierta patogenicidad a pesar de su proximidad genética al resto de las cepas; sin embargo, esta característica aun no ha sido demostrada (Capucci, 1996; Kerr, 2009; Strive, 2010; Le Gall-Reculé, 2011). Estudios filogenéticos han determinado la existencia de dos grupos genéticos de RCV: en primer lugar, el formado por RCV (Italia), cepa Lambay y cepa Ashington. En segundo lugar, el RCV-A1, que debido a su localización geográfica, se explicará en el siguiente apartado. Los calicivirus no patógenos presentan diferente tropismo celular, siendo su órgano diana el

intestino delgado de animales que no muestran síntomas de enfermedad (Strive, 2009). Su ruta de infección es fecal-oral, por lo que su transmisión es rápida y efectiva. Esta es una de las razones que podría explicar su baja patogenicidad, ya que no necesitan causar lesiones o mortalidad para conseguir su dispersión (di Giallonardo, 2014). La resistencia del virus en heces, frente a la que tendría el virus libre en el medio ambiente, facilita el contacto con el virus de un mayor número de animales durante períodos más largos de tiempo.

3.2.2.2 RCV-A1

El RCV-A1 se detectó en Australia a principios del siglo XXI y en Nueva Zelanda en 2016 (Mahar, 2016), aunque se sospecha que su origen en la isla pudo coincidir con la entrada de las primeras poblaciones de conejos en el siglo XIX (Strive, 2009; Jahnke, 2010). La presencia de un ancestro común entre los RCV y el RHDV parece probable (Kerr, 2009), si bien el origen de estos virus aun no se ha determinado con claridad. Al igual que los RCV, con los que se encuentra muy relacionado filogenéticamente, este virus se transmite vía fecal-oral y se encuentra en menor medida en vesícula biliar e hígado. La transmisión por aerosoles se considera poco probable, ya que no se ha observado su presencia en tejido pulmonar o hisopos orales (Strive, 2010).

La importancia de este tipo de virus radica en su capacidad de conferir inmunidad frente al RHDV. En el caso del RCV-A1, su uso como vacuna ha demostrado tasas de supervivencia de 30-50% frente a un desafío con RHDV (Strive, 2010). Estudios recientes sugieren que la efectividad de esta protección es temporal y que, probablemente, la dosis infectiva sea un factor determinante en la misma (Strive, 2013).

Estos datos resultan de especial importancia en el caso del RCV-A1 por su localización en Oceanía, donde el RHDV se utiliza desde hace décadas como método de control biológico de las poblaciones de conejo (Strive, 2009). Por este motivo, la presencia de calicivirus no patógenos que circulen en las poblaciones de forma silenciosa, protegiendo a los animales frente al RHDV es un aspecto a tener en cuenta en esta región.

3.2.2.3 MRCV

El término MRCV se refiere a las siglas en inglés de *Michigan Rabbit Calicivirus*. Esta variante se describió en Michigan, Estados Unidos, en 2001. Se trata de un virus similar al RHDV y al RCV, y se considera que procede de un calicivirus no patógeno (Abrantes, 2010; Suckow, 2012). El virus produce tasas de mortalidad de alrededor del 30% (Abrantes,

2012) y cursa de forma aguda. Los animales experimental congestión conjuntival con descarga ocular, cianosis, apatía, diarrea y, en el caso de las hembras gestantes, hemorragia vulvar. Produce signos neurológicos, fundamentalmente ataxia, vocalización y opistótonos, y los animales mueren de forma súbita. La necropsia revela petequias y equimosis orgánicas, así como hemorragias en pulmón, intestino y útero. El hígado aparece necrótico y la vesícula biliar puede presentar fibrosis periductal. (Bergin, 2009; Suckow, 2012). El virus se detecta fundamentalmente en hígado (Abrantes, 2012). A pesar de la aparente virulencia de este virus, la enfermedad no se ha podido reproducir de forma experimental, por lo que aun existen incógnitas sobre las características de este virus y su patogenicidad (Abrantes, 2012; Suckow, 2012).

3.2.3 El virus del síndrome de la liebre parda europea

El agente etiológico del síndrome de la liebre parda europea (EBHSV)²⁰ pertenece también al Género Lagovirus, por lo que comparte varias características con el RHDV. Al igual que el anterior, el EBHSV presenta un rango de hospedadores muy estrecho; en este caso, su hospedador natural es la liebre, habiéndose descrito casos en *Lepus europaeus*, *L. timidus* (Le Gall-Reculé, 2003)

Puesto que los lagovirus no son cultivables *in vitro* (Wirblich, 1994), el estudio de sus características ha resultado especialmente complejo. A pesar de la controversia inicial sobre el EBHSV y el RHDV, cuyos viriones resultaban indistinguibles a simple vista (Wirblich, 1994), los primeros estudios sobre el RHDV consiguieron determinar que se trataba de virus distintos (Capucci, 1991; Chasey, 1992; Ohlinger, 1993; Nowotny, 1997), aunque muy relacionados (Ohlinger, 1991). A pesar de describirse una estrecha relación antigénica entre ambos (Wirblich, 1994), se determinó que el EBHSV era incapaz de inmunizar a los conejos frente al RHDV, así como de producir enfermedad en esta especie (Chasey, 1992). Sin embargo, múltiples estudios experimentales han tratado de demostrar la presencia o ausencia de protección cruzada entre ambos virus, tanto en conejos como en liebres (Laurent, 1997; Lavazza, 2015). En la actualidad, ambos virus se han caracterizado y pese a su similitud, se ha determinado que se trata de dos agentes patógenos independientes, con hospedadores diferentes y sin presencia de inmunidad cruzada (OIE, 2015; OIE, 2016).

El curso clínico que produce el EBHSV es también similar al producido por el RHDV, justificando la hipótesis que exponía la existencia de dos manifestaciones clínicas producidas

²⁰ Por sus siglas en inglés: *European Brown Hare Syndrome Virus*

por el mismo virus en distintas especies. En ambos casos la enfermedad cursa con elevadas tasas de mortalidad en adultos (90-100%) y se observan hemorragias internas y externas, así como necrosis hepática debido a la degeneración de los hepatocitos. Por este motivo, se propuso el término “hepatitis necrótica infecciosa de los lepóridos” para denominar el complejo formado por ambas enfermedades (Marcato, 1991).

3.2.4 El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo

El agente etiológico de la enfermedad hemorrágica del conejo, se denomina comúnmente RHDV por sus siglas en inglés (Rabbit Haemorrhagic Disease Virus), aunque también se conoce como VEHC por sus siglas en castellano (Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo).

3.2.4.1 Características morfológicas

El RHDV es un virus sin envoltura (Du, 1991) y de pequeño tamaño, cuyo diámetro externo es de 32-35 nm (Valicek, 1990; Liebermann, 1992; Alda, 2008; Hu, 2010). El virus presenta simetría icosaédrica con triangulación T=3 (Smid, 1989; Alexandrov, 1993; Abrantes, 2012). La cápside está formada por 180 monómeros de la proteína de la cápside VP60, cada uno constituido por 3 subunidades cuasiequivalentes, denominadas A, B y C. Estas subunidades se encuentran organizadas en 90 dímeros, 60 de ellos formados por las unidades A-B y los 30 restantes, formados por unidades C-C. Cada uno de los 90 dímeros tiene forma de arco, y se denomina capsómero (Wang, 2013). La estructura final de la cápside es continua y muestra 32 depresiones en su superficie (Abrantes, 2012). La cápside contiene en su interior el material genético, que se halla protegido en una cámara de 25-28 nm de diámetro (Wang, 2013; Hukowska, 2013). La región del virión donde se encuentra el ARN se denomina O (*Core*). Cada monómero de la cápside está formado por dos dominios (Hu, 2010; Wang, 2013):

- Dominio S (*Shell*): es el más interno y tiene dos partes
 - IS (*inner Shell*): se encuentra en la región interna, en contacto con el core
 - S (*capsid Shell*): se encuentra en la región externa, en contacto con el dominio P
- Dominio P (*Protruding*): es el más externo y presenta dos subdominios
 - Subdominio P1: situado en las ramas del arco. Presenta estructuras en forma de hélice (Leuthold, 2015)

- Subdominio P2: se encuentra en la parte más elevada del arco, expuesto al exterior. Presenta dos estructuras flexibles en forma de asa, que contienen 7 regiones de gran variabilidad (V1-V7). La región más expuesta al exterior es V1, que se encuentra yuxtapuesta a 3 bolsillos de unión (Wang, 2013)

La unión de ambos dominios se realiza a través del extremo N-terminal del dominio S, que se une al dominio P (Abrantes, 2012) mediante una región bisagra. Esta zona, denominada NTA, por sus siglas en inglés N-terminal arm, es esencial para la estructura del virión (Wang, 2013). El extremo C-terminal del dominio P se halla orientado hacia el exterior.

Tanto el dominio S como el subdominio P1 son regiones muy conservadas en los calicivirus (Hu, 2010). Sin embargo, el subdominio P2 es muy variable (Wang, 2013), relacionándose esta variabilidad con una mayor variación genética que favorecería la evolución del virus (Abrantes, 2012). La posición de este dominio en la región más externa de la cápside podría justificar su función como diana de anticuerpos y sus implicaciones en la determinación del rango de hospedadores del virus (Abrantes, 2012; Wang, 2013).

3.2.4.1.1 CLP

El término CLP procede de sus siglas en inglés, *Core-like particles*. La presencia de estas partículas virales se ha detectado en casos subagudos de la enfermedad (Granzow, 1996; Martínez, 1998), en hígado y bazo, durante 4-8 días post-infección (Hu, 2010). Estas partículas de superficie lisa, presentan un menor peso molecular que el virión, alcanzando 28-30 Kda y un tamaño de 25-29 nm de diámetro (Moussa, 1992; Shirrmeier, 1999; Hu, 2010; Abrantes, 2012). Se cree que este tamaño corresponde al extremo N-terminal de la proteína VP60. Son partículas no hemaglutinantes, que reaccionan con los anticuerpos del suero (Hu, 2010; Abrantes, 2012). Su origen se atribuye a la degradación de complejos inmunes formados por RHDV-IgM (Hu, 2010).

3.2.4.1.2 VLP

Este término procede de las siglas en inglés de *Virus-like particles*. Estas partículas se forman cuando la proteína de la cápside se expresa en sistemas heterólogos. Su estructura está formada por la cápside sin el material genético del virus, y es indistinguible morfológicamente del virión nativo (Nagesha, 1999). Son partículas hemaglutinantes y se ha demostrado su eficacia en la inmunización de conejos frente al RHDV (Boga, 1997; Abrantes, 2012).

3.2.4.2 Características genéticas

El RHDV presenta ARN monocatenario de polaridad positiva. Su ARN genómico (ARNg), compuesto por 7437 nucleótidos, es coterminal en su extremo 3' con un ARN subgenómico (ARNsg) de 2,2 Kb (Moussa, 1992; Boniotti, 1994; Zhu, 2015) (Fig. 6, 7). El material genético se encuentra unido en su extremo 5' a la proteína VPg, a través de un enlace covalente mediante un residuo de tirosina, mientras que en su extremo 3' está poliadenilado (Seal, 1994; Abrantes, 2012; Zhu, 2015). Existe una región no traducible en cada extremo del genoma.

El ARN genómico se encuentra organizado en 2 ORFs:

- ORF 1:
 - Nucleótidos 10-7044
 - Codifica un polipéptido de 257 KDa, que dará lugar a las proteínas maduras no estructurales (NS1-7²¹), y la proteína estructural de la cápside VP60²²
- ORF 2:
 - Nucleótidos 7025-7338
 - Codifica la proteína estructural VP10

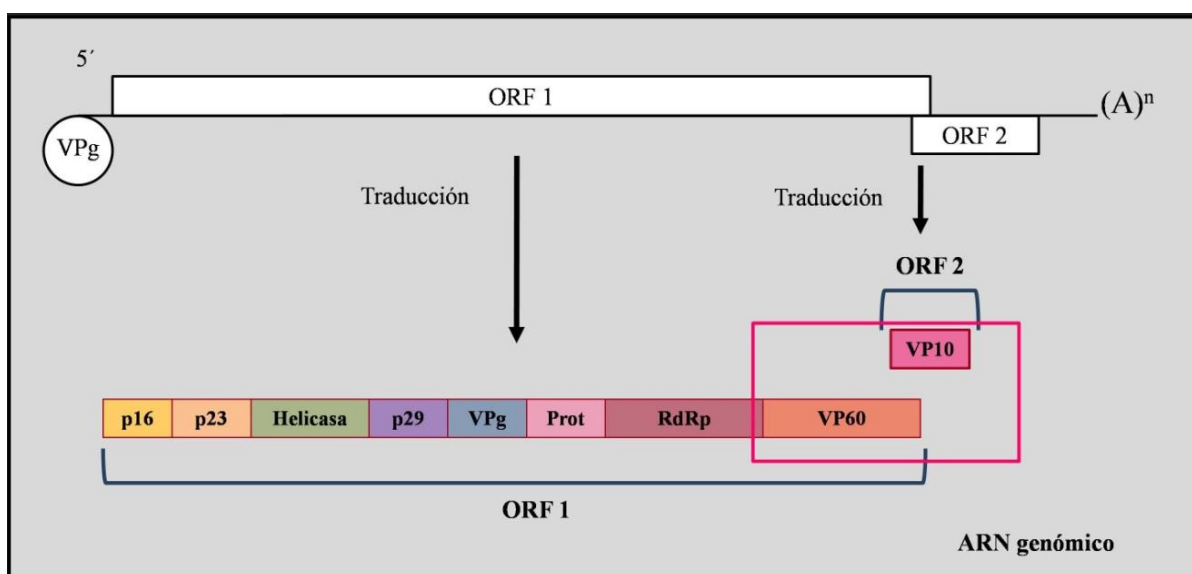


Figura 6. Esquema del ARNg del RHDV (adaptado de VVAA). Se destacan las proteínas estructurales (recuadro)

²¹ De las siglas en inglés *Non-structural*

²² De las siglas en inglés *Viral protein*

El ARN subgenómico codifica la proteína mayor de la cápside, VP60 y la proteína menor VP10.

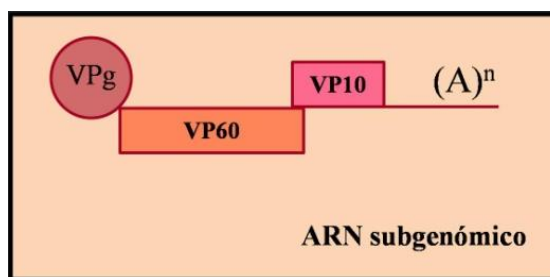


Figura 7. Esquema del ARNsg del RHDV (adaptado de VVAA)

La escisión de la poliproteína precursora en proteínas maduras, se lleva a cabo mediante un proceso de proteólisis post-translacional. Este proceso está mediado por una proteasa codificada en el genoma del virus (Bonioti, 1994; Nagesha, 1999; Abrantes, 2012). Las funciones de estas proteínas son las siguientes:

- NS1 = p16: función desconocida
- NS2 = p23: función desconocida
- NS3 = Helicasa. Participa como catalizador en la uridilación de VPg
- NS4 = p29: función desconocida
- NS5 = VPg: función poco conocida. Se sugiere que está relacionada con la iniciación del proceso de traducción del ARNm, de forma independiente del casquete 5'
- NS6 = Proteasa
- NS7 = RdRp²³: participa en la replicación y en la uridilación de VPg
- VP1: VP60: es la proteína mayor estructural de la cápside. Esta proteína es típica de calicivirus y tiene características inmunogénicas
- VP2: VP10: es la proteína menor de la cápside. Se ha observado que su presencia incrementa los niveles de replicación del virus y promueve la apoptosis. Se considera una proteína reguladora de la diseminación del virus.

(Burroughs, 1984; Parra, 1990; Raschaert, 1995; Le Gall-Reculé, 1998; Joubert, 2000; Abrantes, 2012; Dalton, 2015; Zhu, 2015; Urakova, 2015).

²³ De las siglas en inglés: *RNA-dependent RNA-polymerase*

3.2.4.3 Características físico-químicas

El virus de la enfermedad hemorrágica es muy resistente a las condiciones medioambientales. Resiste temperaturas de hasta 50° durante una hora, así como la congelación y descongelación (OIE, 2015). El tiempo de supervivencia del virus libre en el medio ambiente es cercano a un mes (Henning, 2005a; Henning, 2005b). Su supervivencia en cadáveres alcanza las 3 semanas a 22°C (McColl, 2002) y más de 3 meses si se encuentra dentro del tejido hepático (Henning, 2005b). En refrigeración, se mantiene activo durante más de 7 meses si se encuentra en suspensiones orgánicas. La inactivación mediante agentes químicos es posible, mediante la aplicación de hidróxido de sodio al 1%, hipoclorito de sodio al 0,5%, formaldehído al 1,4% o beta-propiolactona al 0,5%. Su rango óptimo de pH es de 4,5-10,5 (OIE, 2015).

Los primeros estudios sobre el virus determinaron que el RHDV era capaz de aglutinar eritrocitos humanos del tipo O (Parra, 1990), convirtiéndose la HA²⁴ en el método estándar de titulación del virus (OIE, 2016). Ensayos posteriores determinaron que algunos aislados eran capaces de aglutinar eritrocitos de todos los grupos sanguíneos (Xu, 1991), mientras que otros eran poco (Schirrmeier, 1999) o no hemaglutinantes (Capucci, 1996). Estudios posteriores determinaron que RHDV aglutina todos los grupos sanguíneos humanos, y establecieron una serie de patrones de hemaglutinación preferentes para cada genogrupo (Nyström, 2011) (Tabla IV).

Tabla IV. Patrón de aglutinación de eritrocitos humanos (A, B, O) para los genogrupos de RHDV y la variante RHDVb (adaptado de Nyström, 2011). HA débil (+), fuerte (+++), negativa (-)

GRUPO	G1	G2	G3	G4	G5	G6	RHDVb
O	+	+++	+++	-	+	-	-
A	+	+	+	+	+	+	-
B	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Al igual que otros lagovirus, el RHDV no se propaga *in vitro* en cultivos celulares (Rodák, 1990; Wirblich, 1994; Le Gall-Reculé, 2003). A pesar de los intentos llevados a cabo desde el descubrimiento de la enfermedad, no ha sido posible su propagación sobre ninguna

²⁴ Prueba de la hemaglutinación

línea celular, por lo que los estudios de patogenicidad del virus se realizan *in vivo* o mediante sistemas de expresión heterólogos.

3.2.4.4 Grupos genéticos descritos

El RHDV presenta un solo serotipo (Le Gall-Reculé, 1998; Gall, 2006), del que se han identificado 6 genogrupos denominados G1-G6 (Le Gall-Reculé, 2003). La dinámica de estos grupos se corresponde con la esperada en virus ARN, donde es frecuente que unas líneas genéticas desaparezcan coincidiendo con la emergencia de nuevas variantes (Alda, 2010). Se ha determinado que G1, G2 y G3 coexistían en el tiempo, hasta que G3 reemplazó a los anteriores y dio lugar a G4. De forma paralela, en 1994 emergió G5, que en 2000 ya se había convertido en el genogrupo predominante (Le Gall-Reculé, 2003; Duarte, 2014).

Tabla V. Aparición de las primeras variantes del RHDV en diferentes países del Mundo

AÑO	VARIANTE	DESCRIPCIÓN
1996	ITALIA (RCV)	Capucci, 1996
1998	ITALIA (RHDVa)/FRANCIA (RHDVa)	Capucci, 1998
1999	ALEMANIA (RHDVa)	Schirrmeier, 1999
2000	ESTADOS UNIDOS (RHDVa)	
2004	CUBA (RHDVa)	Farnós, 2007
2007	CHINA (RHDVa)	Tian, 2007
2012	FRANCIA (RHDVb)	Le Gall-Reculé, 2011
2013	PENÍNSULA IBÉRICA (RHDVb)/ITALIA	Dalton, 2012;2014/Puggioni, 2013
2014	REINO UNIDO	Baily, 2014; Simpson, 2014; Westcott, 2015
2015	AUSTRALIA/PENÍNSULA IBÉRICA (G1-RHDVb, RCV-RHDVb)	Hall, 2015/Almeida, 2015

Simultáneamente, y de forma independiente, se produjo la emergencia de G6. Esta primera variante del virus, denominada RHDVa, se describió en Europa en 1996 (Capucci, 1998; Le Gall-Reculé, 2003) (Tabla V). La diferencia con el resto de genogrupos, que la identifica como variante, es que difiere tanto genética como antigénicamente del virus original (Capucci, 1998; Hukowska, 2012). La variabilidad entre aislados se encuentra alrededor del

10% (Hukowska, 2013). En 2010 se describió en Francia una nueva variante del virus, que presentaba diferencias significativas con el RHDV (Dalton, 2012). Estas diferencias, tanto antigénicas como patogénicas, favorecieron la diseminación del virus, que en la actualidad ocupa la cuenca Mediterránea y ha llegado a Australia (OIE, 2016; Hall, 2015).

3.3 Epidemiología

3.3.1 Distribución del virus

El RHDV se encuentra distribuido a lo largo de Europa, Asia, África, América y Oceanía, siendo endémico en más de 40 países. El nuevo virus RHDVb ocupa la cuenca Mediterránea y se ha descrito en Australia (OIE, 2016). La presencia de este virus es especialmente preocupante en la Península Ibérica, por lo que se detallará la situación en el apartado 3.3.1.1. Debido a las especiales características de la epidemia en Australia, se explicará brevemente su situación en el apartado 3.3.1.2.

Situación de la Península Ibérica

El conejo europeo, *O. cuniculus*, es originario de la Península Ibérica y en ella se encuentra la mayor diversidad genética en esta especie (Alda, 2010; Lopes, 2017). En la Península existen dos subespecies de conejo: *O.c. cuniculus* y *O.c. algirus*, que no se encuentra en otras regiones del Planeta. La importancia del conejo en esta región radica en su posición en la base de la cadena trófica, puesto que es una de las presas preferidas por los carnívoros silvestres. Además de los pequeños y medianos depredadores, existen dos especies de gran interés ecológico que se alimentan del conejo de forma casi exclusiva (Alda, 2010). Por un lado, el águila imperial (*Aquila adalberti*) y por otro, el lince ibérico (*Lynx pardinus*). Ambas especies se encuentran en peligro de extinción, con poblaciones que han sufrido de forma directa los efectos de la mixomatosis, presente desde los años 50 y de la enfermedad hemorrágica, desde los años 80 (Delibes-Mateos, 2014). Las repercusiones de la RHD²⁵ sobre las poblaciones de lince se han observado desde la primera epidemia que tuvo lugar en Doñana en los años 90 (Villafuerte, 1994), afectando a una población cuyo territorio es muy limitado y donde el número de conejos se ha reducido un 80% durante los últimos años (Delibes-Mateos, 2014). Estudios recientes muestran cómo las dificultades en el acceso al alimento de estos animales, no sólo afectan a parámetros como su condición corporal o el tamaño del área que deben recorrer para alimentarse (Delibes-Mateos, 2014), sino que empeoran radicalmente sus tasas reproductivas (Monterroso, 2016). A pesar de los esfuerzos

²⁵ De sus siglas en inglés: *Rabbit Haemorrhagic Disease, Enfermedad Hemorrágica del Conejo*

que se realizan desde hace décadas para recuperar estas poblaciones (reintroducción de conejos, zonas de alimentación suplementaria, medidas de control reproductivo, vallado de zonas peligrosas), la re-emergencia de la enfermedad provocada por el RHDVb tiene la capacidad de alterar el equilibrio ecológico, al igual que ocurrió con la primera emergencia del RHDV.

La situación geográfica de la Península Ibérica podría justificar la escasa diversidad genética del virus que se encuentra en esta región. El hecho de que los Pirineos pudieran haber actuado como barrera física frente a la propagación es una de las teorías predominantes (Muller, 2009; Alda, 2010). Este aislamiento geográfico justificaría la evolución independiente de los aislados peninsulares, todos procedentes de un mismo genogrupo (G1) que sólo persistió en la Península Ibérica (Abrantes, 2012b). Los estudios filogenéticos realizados sugieren que las relaciones genéticas entre aislados recuperados en zonas cercanas son predominantes sobre las muestras con asociaciones temporales (Muller, 2009; Alda, 2010). Durante años, RHDV-G1 fue el único genogrupo detectado en la Península (Dalton, 2012). Sin embargo, tras la aparición en 2011 del RHDVb (Dalton, 2012), se comunicó que la circulación del RHDVa en la Península, probablemente había comenzado alrededor de 2007 (Abrantes, 2014; Duarte, 2014). Como se había predicho, la variante RHDVa no parecía afectar a los conejos silvestres, pero estaba presente en las granjas, donde se producían brotes esporádicos (Muller, 2009; Lopes, 2017), tal vez debido a la mayor densidad de población (Abrantes, 2014), y se estableció como una variante presente de forma estable en la zona, aunque exclusivamente en animales domésticos (Lopes, 2014). El nuevo virus RHDVb se diseminó rápidamente en la Península, coexistiendo con G1 hasta desplazarlo, y convirtiéndose en endémico (Dalton, 2014; Lopes, 2014). Estudios posteriores determinaron que entre los años 2012-2014, el único virus circulante era RHDVb (Lopes, 2015), que se diseminó con graves consecuencias ecológicas al reducir las poblaciones al 20% de su tamaño original (Almeida, 2015). En 2015, la incidencia de enfermedad hemorrágica clásica en España se consideró nula (MAPAMA, 2015), existiendo, sin embargo, focos de RHDVb a lo largo del territorio.

En cuanto a las islas atlánticas de España y Portugal, se ha descrito que los grupos circulantes son muy similares a los que se hallan en tierra firme, sugiriendo el transporte del virus desde la misma. El genogrupo predominante en las Azores fue el tipo G3-G5, hasta que en 2015, RHDVb se detectó en las islas (Esteves, 2014; Duarte, 2015a; Almeida, 2015), diseminándose rápidamente entre ellas (Duarte, 2015b,c). En las islas Canarias también se ha

descrito la presencia de RHDVb (MAPAMA, 2015; Martín-Alonso, 2016), tanto en conejos domésticos como silvestres. Puesto que en el continente africano sólo se ha descrito este virus en Túnez, parece más que probable que la introducción del mismo no haya ocurrido de forma natural, a través de aves o insectos, sino a través de desplazamientos humanos. Del mismo modo que en el resto de regiones peninsulares, el RHDVb está desplazando a las formas clásicas del virus, lo que sugiere que esta variante debe tener algún tipo de ventaja selectiva sobre RHDV (Lopes, 2014; Martín-Alonso, 2016).

En la actualidad, existen 3 grupos de virus circulando en la Península Ibérica y sus islas. Por un lado, el nuevo virus RHDVb, se encuentra en todo el territorio y presenta gran facilidad de dispersión. Por otro lado, dos cepas recombinantes parecen haber aparecido como resultado de la interacción del nuevo virus con G1 (RHDVb-G1), así como con virus no patógenos (RHDVb-NP) (Lopes, 2017). La aparición de virus recombinantes en la Península resulta de especial interés, dadas las importantes implicaciones ecológicas que tiene el conejo en la zona; por tanto, la presencia de variantes del virus de alta patogenicidad o de consecuencias desconocidas, plantea una situación de alerta, al menos, temporal.

3.3.1.1 Situación de Australia y Nueva Zelanda

A pesar de que el conejo doméstico llegó a Australia en 1788, hasta 1859 no se liberaron conejos silvestres en la isla (Jahnke, 2010), constituyendo el inicio de un importante desequilibrio ecológico. A partir de una población inicial de 24 animales, en 3 años se habían multiplicado alcanzando varios millares (Jahnke, 2010), y su extensión aumentaba a un ritmo de 70-100 Km por año hacia 1890. Los conejos utilizaban las madrigueras de otros animales, compitiendo con ellos por el alimento y el refugio, poniendo en riesgo las especies autóctonas, tanto vegetales como animales (Nyström, 2011). Australia experimenta la peor extinción de mamíferos de los últimos siglos, con un 10% de especies extintas y un 43% en situación de riesgo (Pedler, 2016), por lo que la presencia de una especie competidora como el conejo, prolífica y adaptable al medio, constituye un problema grave.

Por este motivo se determinó tomar una serie de medidas especiales de control, como la introducción de la mixomatosis en la isla en los años 50. Sin embargo, ni estas medidas ni las que se llevaron a cabo de forma complementaria (caza, utilización de veneno, cepos), fueron suficientes para regular la descontrolada población de conejos de la isla. El descubrimiento del RHDV constituyó una nueva arma de control biológico, que comenzó a

usarse en los años 90 (Kovaliski, 2013) y continúa usándose hoy en día. El uso de cebos comerciales²⁶, la diseminación de cadáveres infectados en el campo y los cebos caseros cubiertos por soluciones del virus (O’Keefe, 1999; Henning, 2005), son algunas de las actividades que durante décadas se han llevado a cabo sin regulación (Sanson, 2000), con el objetivo de exterminar a los conejos

A pesar de los esfuerzos realizados para controlar estas poblaciones y de que los brotes continúan apareciendo con cierta periodicidad, probablemente debido a la participación de vectores (Eden, 2015a,b), no ha sido posible disminuir la carga de conejos hasta niveles que el ecosistema pueda soportar. Se ha alcanzado una situación de equilibrio entre virus y poblaciones de conejo, probablemente debido a la adquisición de resistencia de los animales y a la disminución de la virulencia de algunas cepas, que impide la disminución drástica del tamaño de las poblaciones. Un factor a tener en cuenta en la creación de este equilibrio es la reciente aparición de un calicivirus no patógeno (RCV-A1), que podría estar inmunizando a los animales al circular de forma silenciosa en la isla (Strive, 2009). La detección de una cepa recombinante similar a la descrita en las Azores (RHDVb-G1) y hasta el momento nueva en la isla, podría desplazar este equilibrio en favor de la enfermedad (Hall, 2015).

3.3.2 Hospedadores

3.3.2.1 Hospedador natural

Los calicivirus presentan un estrecho rango de hospedadores (Chasey, 1992; Lavazza, 1996; Alda, 2008). En el caso del RHDV, el hospedador natural es el conejo europeo *O. cuniculus*, que se encuentra distribuido mundialmente. La variante clásica del virus produce enfermedad en los animales mayores de 2 meses, mientras que en los gazapos puede cursar de forma subclínica y desarrollar inmunidad frente al virus. En el caso del RHDVb, los animales afectados son los conejos de 15-40 días (ISU, 2007; Abrantes, 2012; OIE, 2016).

3.3.2.2 Hospedadores accidentales

La enfermedad hemorrágica del conejo no se produce en especies distintas de *O. cuniculus* (OIE, 2016). Sin embargo, existe constancia de la presencia del virus RHDV-G1 en muestras aisladas en Portugal, en 1990, a partir de una liebre de la especie *L. granatensis*, cuyos síntomas eran compatibles con la infección (Lopes, 2014). En el caso de la variante RHDVb, sin embargo, desde 2011 se ha detectado la presencia de ARN del virus en tejidos de

²⁶ Estos cebos están fabricados a partir de la cepa checa *CAPM-V-351* y comercialmente se denominan RHDV351-INOC

Lepus corsicanus, *L. europaeus*, *L. granatensis* y *L. capensis mediterraneus* (Camarda, 2014; OIE, 2015; Velarde, 2016; Hall, 2017). Estos animales mostraban signos clínicos compatibles con la enfermedad hemorrágica y al síndrome de la liebre parda europea, y se encontraban en zonas de gran presión poblacional de conejos, donde se han detectado brotes.

En áreas donde el virus circula de forma habitual y los animales están expuestos a elevadas concentraciones del mismo, el virus puede ser capaz de inducir la enfermedad en liebres, especialmente en el caso de animales cuyo sistema inmunitario se encuentre debilitado. A pesar de que estas infecciones puedan constituir casos de *spillover*²⁷ (Velarde, 2016; Hall, 2017), la frecuencia de detección del RHDVb en liebres desde su aparición, sugiere la posibilidad de que el virus haya experimentado un salto de especie. En caso de ser así, el RHDVb sería el primer lagovirus con dos hospedadores naturales (Lavazza, 2015; Puggioni, 2013).

3.3.2.3 Infección experimental heteróloga

Diversos estudios han tratado de determinar si el virus es capaz de producir enfermedad en especies distintas al conejo, como murciélagos o kiwis, en Oceanía (Buddle, 1997). La infección experimental de 28 especies de vertebrados, no ha mostrado la producción de enfermedad ni la replicación vírica en estos organismos (Wirblich, 1994; Gould, 1997; ISU, 2007; Lavazza, 2015; OIE, 2015); OIE, 2016). No obstante, se ha observado reiteradamente que animales expuestos al virus experimentan seroconversión tras la exposición y eliminan partículas víricas en heces (Zheng, 2003; Merchán, 2011; OIE, 2016; Rocha, 2017). Este fenómeno se detectó por primera vez en zorros silvestres, que presentaban anticuerpos tanto frente al RHDV como frente al EBHSV, demostrando la circulación del virus en las poblaciones de conejo de las que se alimentaban (Frolich, 1998; Philbey, 2005). Posteriormente, en Nueva Zelanda, un estudio serológico identificó la presencia de anticuerpos frente al RHDV en diversas especies de mamíferos (gatos, hurones, erizos, liebres, armiños) y de aves (halcones, gaviotas) en zonas con presencia del virus. A pesar de no haberse localizado el foco de la infección, los datos serológicos apuntan a la actividad predatoria y carroñera de estos animales como origen de la exposición (Parkes, 2004).

²⁷ Daño colateral. Infección accidental de un animal de especie distinta a la del hospedador específico. Normalmente la infección es letal y la transmisión del patógeno finaliza en dicho punto.

3.3.3 Vías de transmisión

El virus se transmite de forma horizontal por contacto directo o por aerosoles (Chasey, 1994), por vía oral, oro-nasal, conjuntival y parenteral (Abrantes, 2012). Existe eliminación del virus en todas las secreciones (Xu, 1991), así como en heces y en orina. La diseminación del virus a través del pelo, piel o tejidos orgánicos también es eficaz. Es frecuente la transmisión del virus a través de fómites, alimentos, agua de bebida, elementos de la cama, jaulas y equipamiento (Abrantes, 2012). En el caso de la enfermedad hemorrágica del conejo cobra especial importancia la transmisión vectorial. Se considera que esta transmisión es de tipo mecánico, puesto que no se ha observado replicación en los vectores (Henning, 2005-2). Existen múltiples estudios que demuestran la transmisión del virus por diferentes especies de insectos (Mutze, 1998), fundamentalmente moscas (Lugton, 1999; McColl, 2002; Henning, 2005c) y mosquitos (McColl, 2002), aunque no se excluye la transmisión por artrópodos (Henning, 2005b).

La transmisión del virus, en el caso de producirse una picadura, es muy probable, ya que el aparato bucal de los insectos penetra en la epidermis y realiza succión y regurgitación simultáneas (McColl, 2002). El virus permanece activo en el aparato bucal hasta 11 días tras alimentarse en tejidos contaminados (Henning, 2005b), tiempo que favorece la dispersión espacial de la enfermedad a través del vector. En cuanto a la transmisión sin picadura, se ha demostrado que es posible la infección por vía conjuntival mediante vectores. El virus permanece viable hasta 7 horas en las patas de insectos que se han posado sobre tejidos contaminados (Asgari, 1998; McColl, 2002), así como en sus secreciones orales y anales. La diseminación del virus a través de otros animales, fundamentalmente carroñeros, ha sido estudiada por las implicaciones que puede tener en la dispersión de la enfermedad a distancia. Las aves son el vector más estudiado, puesto que facilitan el transporte del virus entre islas, aunque no se debe descartar el papel de los carnívoros terrestres en la diseminación de la enfermedad (Chasey, 1994; Mutze, 1998).

3.3.4 Factores implicados en la diseminación de la enfermedad

Existen diversos estudios epidemiológicos cuyo objetivo es determinar si existe una relación entre ciertos parámetros medioambientales o individuales y la prevalencia de la enfermedad (Henning, 2005). Se ha determinado que factores como la luz UV, la temperatura y la humedad, son factores que podrían tener un gran impacto sobre la supervivencia del virus en el ambiente (Henning, 2005b). En Australia se ha observado una relación entre las bajas

temperaturas y el aumento de los casos (Sanson, 2000), probablemente debida a la mayor supervivencia del virus a estas temperaturas. Sin embargo, los ambientes secos y las temperaturas elevadas de forma sostenida, ponen en peligro la integridad del virus (OIE, 2015).

A pesar de la importancia de estos factores, la mayor parte de los estudios apuntan a una marcada influencia estacional como el elemento clave en la aparición de brotes de enfermedad. La época de cría se considera una fase especialmente crítica, debido a factores de tipo hormonal e inmunitarios (Cooke, 2000; White, 2004), por lo que el número de brotes podría incrementarse en primavera, afectando además a los individuos juveniles sin inmunidad. El segundo parámetro que determina la influencia estacional sobre la prevalencia de los brotes, es la actividad de los vectores. Si bien es cierto que en ciertas regiones geográficas el volumen de parásitos es regular durante todo el año, lo más habitual es que su presencia sea mayor en los meses cálidos, constituyendo un importante elemento de transmisión del virus, incluso a grandes distancias (McColl, 2002; White, 2004; Abrantes, 2012).

3.4 Patogenia

Durante los primeros brotes de la enfermedad se observó una morbilidad del 100% y tasas de mortalidad superiores al 90% en adultos (Parra, 1990; OIE, 2015). Sin embargo, se ha comprobado que estos parámetros fluctúan entre cepas, considerándose que la morbilidad se encuentra entre el 30-100% y la mortalidad entre el 40-100% en adultos (ISU, 2007; OIE, 2016). Los animales menores de 2 meses son menos susceptibles a la enfermedad, y los menores de 4 semanas son resistentes (OIE, 2015). En cuanto a la variante RHDVb, inicialmente se describió como una infección que cursaba con tasas de mortalidad del 80-90%, tanto en animales domésticos como silvestres, menores de 30 días (Le Gall-Reculé, 2011; Dalton, 2012). En la actualidad, se considera que las tasas de mortalidad pueden oscilar entre el 5-70%, siendo lo más habitual que se sitúen alrededor del 20% (OIE, 2015), tanto en la infección natural como experimental. Los animales que han mostrado mayor predisposición a sufrir la enfermedad son los gazapos de 15-25 días (Puggioni, 2013; Capucci, 2017).

El período de incubación del RHDV es de 1-3 días (Henning, 2005b; Abrantes, 2012; OIE, 2015) y de 3-5 días en el RHDVb (OIE, 2016). Los animales mueren 12-36 h después del inicio de la fiebre, que generalmente supera los 40°C, seguido de hipotermia (Abrantes, 2012; OIE, 2015; Trzeciak, 2015). La evidencia de que la proteína RdRp es funcional a

temperaturas superiores a los 40°C, sugiere que el virus continúa replicándose en el animal, incluso en las fases finales de la enfermedad (Urakova, 2016). Se ha determinado que la duración del período de incubación del virus puede estar relacionada de forma inversa con la dosis infectiva (Henning, 2005b). Para el RHDV, se ha determinado que la dosis mínima capaz de producir enfermedad en el conejo es de 10-100 partículas virales (McColl, 2002). Esta dosis es además letal tanto por vía conjuntival como por ingestión (Henning, 2005b).

3.4.1 Ciclo biológico del virus

3.4.1.1 Ciclo celular del virus

A pesar de las limitaciones que existen para el estudio de la mayor parte de estos virus, debido a la incapacidad para su cultivo in vitro, se han desarrollado mecanismos alternativos, como los replicones, que permiten estudiar sus características, así como su ciclo vital. Estos virus se adhieren al receptor ubicado en la superficie de la célula y acceden a su interior, donde se produce la decapsidación y la liberación del genoma en el citoplasma. El genoma se encapsida en vesículas endocíticas, y la proteína VPg (unida al extremo 5' del ARNg y ARNsg) interacciona con la maquinaria celular para iniciar la traducción. El ORF 1 codifica un precursor polipeptídico y la proteína de la cápside (VP60), mientras que el ORF 2 codifica la proteína estructural VP10. El ARNsg codifica las proteínas estructurales (VP60 y VP10). Tras la traducción del precursor polipeptídico codificado por el ORF 1, la proteasa cataliza su escisión en proteínas no estructurales y proteína de la cápside (VP60). El complejo de replicación formado por las proteínas no estructurales, helicasa y RdRp, sintetiza el ARN de polaridad negativa que servirá como molde para la formación del ARN genómico y subgenómico. Tras la traducción del ARN, se puede producir un nuevo ciclo, o bien el empaquetado del genoma y la liberación de las partículas virales al exterior de la célula infectada (Rohayem, 2010; Abrantes, 2012).

3.4.1.2 Diseminación orgánica del virus

Tras su entrada en el organismo, el virus llega al hígado por vía hemática durante las primeras 12 horas (Prieto, 2000; Jung, 2000). La replicación tiene lugar en el citoplasma de los hepatocitos (Rodák, 1990; Park, 1992; Prieto, 2000), comenzando en la región centrolobulillar y avanzando hacia la periferia, durante las primeras 36-48 hpi (Jung, 2000). En este momento, el virus ha colonizado los hepatocitos y las células de Kupfer del hígado, y por vía sanguínea se dirige al bazo, donde infecta los macrófagos y linfocitos, fundamentalmente en la pulpa roja (Prieto, 2000). Las primeras lesiones en el tejido renal y

pulmonar comienzan a observarse 24 hpi (Jung, 2000). El antígeno viral se puede observar en las células renales, que desarrollan necrosis, y en los macrófagos pulmonares. Una vez colonizados los órganos diana, el virus continúa diseminándose por el organismo, y alcanza otros tejidos de forma secundaria, como los linfonódulos, la mucosa intestinal, el timo, el tejido cardíaco, el sistema nervioso central o el tejido ovárico (Ramiro, 1999; van de Bildt, 2006). Algunos estudios afirman que, tras la replicación hepática, el virus regresa al intestino por vía biliar (Marcato, 1991).

La presencia de antígeno en el interior de los macrófagos se debe a que las células del sistema retículo-endotelial se ocupan de la eliminación del virus circulante; las células de Kupfer del hígado muestran un papel preponderante en esta función, mientras que los macrófagos esplénicos, pulmonares y de los linfonódulos, participan en menor medida (Kimura, 2001). Mientras que la presencia del virus en el interior de los macrófagos y su diseminación a través de los mismos, se ha explicado tradicionalmente por el proceso de fagocitosis (Teifke, 2002), la posible replicación vírica en el interior de los macrófagos continúa siendo una hipótesis (Alexandrov, 1992; Kimura, 2001; Chen, 2008; Abrantes, 2012).

3.4.2 Clínica de la enfermedad

3.4.2.1 Signos clínicos de la enfermedad

La enfermedad hemorrágica cursa con una serie de signos clínicos inespecíficos, que se acompañan de otros que resultan casi patognomónicos. Los primeros síntomas que se observan en los animales son fiebre superior a 40°C (Abrantes, 2012; OIE, 2015; Trzeciak, 2015) y apatía. Es frecuente la presencia de anorexia, letargia y postración repentinas. Estos signos se acompañan de manifestaciones respiratorias, como taquipnea, respiración estertórea, descarga nasal, congestión y descarga conjuntival, taquipnea y taquicardia. El avance del cuadro clínico da lugar a síntomas relacionados con trastornos en la coagulación, como hematuria, diarrea sanguinolenta o epistaxis. Los signos neurológicos son tanto de tipo motor (paresia posterior, ataxia, pedaleo), como al estado de consciencia del animal (convulsiones, vocalizaciones, coma), y son indicadores de gravedad clínica (Teifke, 2002; Ferreira, 2004; Donnelly, 2013; OIE, 2016; Suckow, 2012). Es frecuente la aparición de opistótonos, epistaxis, ictericia y distensión abdominal como hallazgos post-mortem en animales infectados por el RHDV, siendo los dos primeros signos muy indicativos de la infección.

3.4.2.2 Formas clínicas de la enfermedad

Existen varias presentaciones clínicas de la RHD, si bien lo más frecuente es observar un curso hiperagudo o agudo, en que los animales mueren en menos de 96 hpi (Teifke, 2002). Sin embargo, es posible observar un curso crónico o subclínico en un 5-10% de los animales (Le Gall-Reculé, 2013; OIE, 2015). Las presentaciones clínicas que se pueden encontrar en conejos adultos infectados por RHDV son las siguientes:

- **HIPERAGUDA:**
 - Los animales mueren de forma súbita, sin signos clínicos
 - La condición corporal del animal es buena debido a la inmediatez del cuadro
 - Muerte en 24-36 hpi
- **AGUDA:**
 - Los animales experimentan signos inespecíficos (congestión conjuntival, lagrimeo, anorexia, apatía, ictericia, cianosis), respiratorios (traqueítis, disnea, descarga nasal espumosa) y neurológicos (opistótonos, estados de excitación-postración, paresia, ataxia)
 - Muerte en 48-72 h
- **SUBAGUDA:**
 - La sintomatología es similar, aunque la severidad de los síntomas es menor
 - En la mayor parte de los casos, los animales desarrollan anticuerpos y sobreviven
 - El curso clínico oscila entre unos días y algunas semanas, según los casos
- **CRÓNICA/SUBCLÍNICA:**
 - Los animales experimentan un curso clínico de 1-2 semanas. Tras este período, la mayor parte de los animales muestran una fuerte seroconversión y sobreviven
 - Es frecuente la presencia de anorexia, pérdida de peso, letargia e ictericia
 - Ictericia, anorexia, letargia

En el caso de los gazapos infectados por el RHDV, el curso clínico es subclínico, con presencia de seroconversión (Donnolly, 2013; Le Gall-Reculé, 2013; OIE, 2015). Estos animales experimentan un cuadro clínico muy similar al producido por la variante clásica del virus, si bien la frecuencia de presentación de cuadros subagudos y crónicos es superior al

10%. Los animales experimentan signos respiratorios (congestión nasal y conjuntival, epistaxis, neumonía, traqueítis, descarga nasal espumosa), así como sistémicos (fiebre, anorexia, apatía, hematoquecia, ictericia). Los signos neurológicos (convulsiones, vocalización, ataxia, opistótonos) también aparecen en la infección por este virus (Dalton, 2012; Duarte, 2015).

3.4.3 Órganos diana: lesiones macroscópicas e histológicas

3.4.3.1 Órganos diana

3.4.3.1.1 Hígado

a. Alteraciones macroscópicas

Los signos más característicos de infección por el RHDV son la presencia de hepatomegalia (Abrantes, 2012), con decoloración zonal de la superficie hepática (Alonso, 1998), marcado patrón lobulillar (Ramiro, 1999) y textura friable (Donnolly, 2013; OIE, 2016).

b. Alteraciones histológicas

En el hígado se observa necrosis de los hepatocitos, que se extiende de la región periportal a la mediozonal y de ésta a la periacinar (Brander, 1992; Prieto, 2000; Suckow, 2012). Las células muestran diferentes fases de daño celular, simultáneamente; es frecuente observar picnosis, cariorrexis y cariólisis (Teifke, 2002; Ferreira, 2006a,b), así como hepatocitos vacuolizados (Alonso, 1998; Abrantes, 2012; Duarte, 2015). En algunos hepatocitos se pueden observar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de tipo acidófilo (Duarte, 2015). Es frecuente la presencia de microtrombos en los vasos sanguíneos, así como infiltración linfocítica en las áreas de necrosis y activación de las células de Kupfer (Abrantes, 2012). En formas subagudas se pueden encontrar focos de regeneración hepática (Donnolly, 2013). La imagen histológica del órgano es de hepatitis necrotizante (Abrantes, 2012; Duarte, 2015).

3.4.3.1.2 Bazo

a. Alteraciones macroscópicas

El signo más significativo es la esplenomegalia (Suckow, 2012; Abrantes, 2012). El órgano aparece congestivo y con coloración rojiza oscura (Donnolly, 2013; OIE, 2016).

b. Alteraciones histológicas

Se observa reducción folicular, dilatación sinusal (Ramiro, 1999) y depleción linfoides (Donnolly, 2013). Las células aparecen en estado de cariorrexis y picnosis, lo que da lugar a leucopenia (Prieto, 2000; Abrantes, 2012). Se puede observar hemosiderosis (Abrantes, 2012).

3.4.3.1.3 Pulmón

a. Alteraciones macroscópicas

Los pulmones se encuentran edematosos y congestivos (Prieto, 2000; OIE, 2016). La superficie del órgano muestra la presencia de petequias o hemorragias de extensión variable (Fuchs, 1992; Mikami, 1999; Duarte, 2015) y la apertura de la tráquea y bronquios principales muestra la presencia de fluido espumoso sero-hemorrágico (Donnolly, 2013).

b. Alteraciones histológicas

El órgano se observa hiperémico, presenta hemorragias intraalveolares y perivasculares, así como trombosis (Donnolly, 2013). El edema alveolar y la proliferación linfoides son hallazgos frecuentes (Prieto, 2000; Abrantes, 2012). En algunos casos se aprecia bronquiolitis catarral (Abrantes, 2012).

3.4.3.1.4 Riñón

a. Alteraciones macroscópicas

Los riñones aparecen aumentados de tamaño y muestran una coloración oscura, con presencia de petequias (Mikami, 1999; Suckow, 2012). El corte longitudinal del órgano puede revelar hemorragias zonales (Fuchs, 1992; Abrantes, 2012).

b. Alteraciones histológicas

Se observa congestión, áreas de hemorragia y trombosis (Donnolly, 2013). La luz de los vasos puede aparecer ocluida con depósitos de fibrina, lesionando el glomérulo renal (Ramiro, 1999). Los túbulos renales se encuentran dilatados y el epitelio tubular aparece degenerado (Ramiro, 1999; Abrantes, 2012). Es frecuente la presencia de trombos hialinos de diferente magnitud (Abrantes, 2012).

3.4.3.2 Otras lesiones orgánicas

La mucosa traqueal suele aparecer hiperémica y contiene fluido sero-hemorrágico (Abrantes, 2012; Donnolly, 2013). Estas lesiones son bastante frecuentes en los animales infectados por el RHDV. En cuanto al sistema digestivo, el intestino puede presentar enteritis necrotizante, con atrofia de las microvellosidades y hemorragias subserosas, petequias o equimosis (Suckow, 2012; Abrantes, 2012). Los linfonódulos digestivos, al igual que otros linfonódulos orgánicos, aparecen edematosos y congestivos, y en ocasiones muestran petequias (Suckow, 2012). Se han observado lesiones leves en páncreas (Trzeciak, 2015).

El tejido muscular no suele experimentar graves lesiones derivadas de la infección. El músculo liso puede aparecer anémico, mientras que el músculo cardíaco suele mostrar congestión, petequias, degeneración de las fibras miocárdicas, necrosis focal y hemosiderosis (Abrantes, 2012). En otros órganos, como tonsilas, vejiga de la orina, ovarios y tejido subcutáneo, también se han descrito lesiones, fundamentalmente de carácter hemodinámico (Donnolly, 2013; Trzeciak, 2015). El Sistema Nervioso Central puede mostrar microinfartos, derivados de los signos clínicos de tipo neurológico (Suckow, 2012). Es frecuente encontrar pequeñas hemorragias corticales, congestión vascular y, con menor frecuencia, infiltración linfocitaria (Abrantes, 2012).

3.4.3.3 Alteraciones producidas por RHDVb:

El RHDVb se ha detectado en hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino y corazón y produce lesiones similares a las producidas por el RHDV. Sin embargo, la presencia de virus en el intestino es característica del RHDVb (Dalton, 2012). El hígado aparece pálido o congestivo, y se observan focos de necrosis focal o difusa (Dalton, 2012; Duarte, 2015). La estructura tisular se altera debido a la importante degeneración celular que tiene lugar, y que cursa de forma similar a la descrita en el RHDV. El bazo se halla aumentado de tamaño, congestivo y friable, mientras que los riñones muestran coloración oscura y aspecto congestivo. Los pulmones se encuentran severamente congestivos, y muestran petequias o hemorragias que pueden llegar a ocupar los lóbulos por completo. Se aprecia abundante edema alveolar, así como hemorragias. Las lesiones de tipo hemorrágico son frecuentes en la mayor parte de los órganos, fundamentalmente en tráquea, pulmón, corazón, hígado, riñón e intestino, y son un signo indicativo de la infección (Dalton, 2012; Duarte, 2015).

3.4.4 Diagnóstico presuntivo

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se puede llevar a cabo a partir de las observaciones clínicas y de la necropsia de los animales. Son signos clínicos especialmente significativos la fiebre elevada de aparición repentina, seguida de apatía severa y ataxia. Los animales con epistaxis y en posición de opistótonos son muy sospechosos de estar infectados con el virus. Durante la necropsia, los signos principales son la hepatomegalia, con marcado patrón lobulillar y descoloración no uniforme de la superficie hepática, así como la esplenomegalia. Esta primera aproximación diagnóstica es útil para establecer las medidas a tomar en caso de que se trate de un brote, pero en ningún caso servirá como diagnóstico oficial de la enfermedad, que deberá realizarse mediante el método estándar (ELISA-DAS), o ser llevado a cabo por el Laboratorio Central (Algete). Las indicaciones sobre el procedimiento a seguir en caso de sospecha de enfermedad se encuentran disponibles en el “Plan de Vigilancia de la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica del conejo” (MAPAMA, 2014) y el “Plan Nacional de vigilancia sanitaria en fauna silvestre” (MAPAMA, 2017).

3.4.5 Diagnóstico diferencial

En el momento de establecer los diagnósticos diferenciales con la RHD, se deberán tener en cuenta las enfermedades infecciosas que pueden cursar de forma hiperaguda, como la pasterelosis, la enterotoxemia, así como otras causas de septicemia acompañada de CID. Asimismo, no se descartarán causas no infecciosas de enfermedad fulminante que puedan cursar con hemorragias y CID, especialmente un posible envenenamiento o un golpe de calor (ISU, 2007; OIE, 2016).

3.4.6 Alteraciones en los parámetros fisiológicos

Durante la infección con el RHDV se han descrito diversas alteraciones de los parámetros fisiológicos, que afectan fundamentalmente a las funciones hepática, renal y hemodinámica (Xu, 1989). La suma de estas alteraciones da lugar a un fallo multiorgánico que compromete gravemente la vida del animal. Los valores de los parámetros hepáticos se desvían de los límites fisiológicos como consecuencia directa de las lesiones producidas por el virus en el tejido del órgano. La formación de vacuolas intracitoplasmáticas, así como las lesiones mitocondriales en los hepatocitos (Ferreira, 2006c), dan lugar a un aumento de las transaminasas (GGT, AST, ALT). De forma paralela, se produce colestasis, lo que contribuye al incremento de los triglicéridos (Chen, 2008). La depleción de los gránulos de glucógeno

celulares provoca la destrucción del retículo endoplásmico, lo que reduce notablemente la función de detoxificación del hígado (Ferreira, 2006; Chen, 2008). La ausencia de células funcionales capaces de realizar la gluconeogénesis y almacenar el glucógeno, contribuyen al estado de hipoglucemia severa que se mantiene hasta las últimas fases de la enfermedad (Chen, 2008).

En el caso del riñón, las lesiones celulares inducidas por el virus, contribuyen a los desequilibrios en la función del órgano (Donnolly, 2013). La destrucción de las células renales afecta a los mecanismos de filtración y reabsorción, produciéndose una alteración de la homeostasis cuyo resultado es un desequilibrio electrolítico (Chen, 2008). Se ha determinado que el BUN aumenta durante la infección con el RHDV, causando una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) del 40-60%. De forma simultánea se produce un incremento de la creatinina, acompañado de hipernatremia e hipercalemia (Chen, 2008).

Las alteraciones de tipo hemodinámico que se encuentran durante la infección con el RHDV son muy características; los animales experimentan un cuadro de tipo trombotico-hemorrágico, compatible con CID (Fuchs, 1992; Ueda, 1992; Prieto, 2000) durante las fases finales de la enfermedad. El origen de este síndrome puede estar relacionado tanto con la destrucción de células endoteliales como con la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Park, 1997). Además, el CID puede producirse durante las fases finales del fallo renal (Ferreira, 2006), debido a la gravedad de las lesiones hepáticas y esplénicas y como resultado de un cuadro tóxico relacionado con la producción masiva de CK. El CID se desencadena al alterarse el equilibrio entre producción y eliminación de los factores de coagulación (Teifke, 2002). Se observa un incremento en la producción de trombina junto con un aumento en la síntesis de fibrina, facilitando una mayor agregación plaquetaria, que disminuye su recuento en sangre (Ueda, 1992) y contribuye a la producción de trombosis (Ferreira, 2006; OIE, 2013). Los niveles de antitrombina III disminuyen (Ueda, 1992), por lo que no se compensa la formación de microtrombos que tiene lugar en los vasos. Por su parte, éstos trombos contribuyen al daño endotelial, cuya consecuencia directa es la producción de hemorragias (Teifke, 2002). Se ha determinado que las diferencias en la actividad hemaglutinante de distintas cepas de RHDV pueden estar relacionadas con su acción lesiva sobre el endotelio vascular y, por tanto, constituir un elemento indicativo de patogenicidad de las cepas (Niedzwiedzka, 2012a,b; Niedzwiedzka, 2013a,b,c,d). Se ha sugerido que la CID podría ser el principal motivo de mortalidad derivada de la infección por el RHDV (Trzeciak, 2015). No

obstante, el cuadro clínico que experimentan los animales, cuenta con varios factores que pueden contribuir a la letalidad de la enfermedad. En primer lugar, la hipoxia hepática y la isquemia (Teifke, 2002) producen una grave disfunción hepática y renal, cuyas consecuencias son la colestasis (Ferreira, 2006), hipernatremia e hipercalcemia (Chen, 2008). Puesto que ambos órganos tienen una función detoxificante del organismo, su disfunción resulta especialmente grave. El desequilibrio electrolítico producido por la incapacidad para producir correctamente la orina, puede desencadenar alteraciones cardíacas graves en el animal. Además, el incremento de BUN y creatinina en sangre (Ferreira, 2006), pueden tener como consecuencia una encefalopatía hepática (Donnolly, 2013) que puede provocar alteraciones de tipo nervioso (incoordinación, desorientación, convulsiones, coma).

El cuadro nervioso que precede a la muerte de los animales, se encuentra agravado por la hipoglucemia subyacente (Ferreira, 2006; Trzeciak, 2015). Esta hipoglucemia es resultado, por un lado, del ayuno prolongado y, por otro, de la lesión directa de los hepatocitos, y contribuye tanto a los signos inespecíficos observados (apatía, letargia), como a los signos nerviosos (Chen, 2008). Durante las fases finales de la enfermedad, estos signos pueden agravarse debido a la hipotermia, a la que contribuyen factores como la hipoglucemia, la uremia y la hipoxemia, entre otros (Maté, 2017).

3.4.7 Mecanismos de resistencia a la enfermedad

3.4.7.1 Respuesta inmune y resistencia innata a la infección

La respuesta inmune frente al RHDV se desarrolla de forma rápida tras la infección. Los macrófagos participan en la respuesta inicial a la infección (Huang, 1991) y son responsables de la liberación de citoquinas, la fagocitosis de partículas víricas y restos celulares y la presentación de antígenos. La respuesta inmune de tipo humoral es esencial en la protección, y aparece posteriormente (Ferreira, 2005; McIntosh, 2007). Las células del sistema inmunitario, así como los órganos linfoides, resultan especialmente afectados durante la infección por el RHDV. En el caso de los animales menores de 2 meses, el sistema inmune se encuentra en proceso de maduración. Las inmunoglobulinas presentes en el neonato, especialmente IgG, proceden en su mayor parte de la madre, hasta que el animal comienza a producir las propias, sobre las 4 semanas de edad. Por este motivo, el título de anticuerpos en el neonato es similar al que presenta la madre (Cooke, 2000).

En el caso concreto del RHDV, los animales menores de 8 semanas de edad son resistentes a infección, tanto natural como experimental (Henning, 2005b-2; Ferreira, 2008). Cuando estos

animales se infectan, excretan el virus sin sufrir la enfermedad, y adquieren resistencia frente a la misma, por lo que en áreas de elevada circulación del virus, las poblaciones jóvenes expuestas al virus no desarrollan la enfermedad en la edad adulta, disminuyendo la incidencia de enfermedad (Alda, 2008). La lucha contra el virus comienza con una producción temprana de IgM, y un incremento de IgA e IgG que perdura tras disminuir las IgG (Matthaei, 2014; Abrantes, 2012). Transcurrida una semana desde la infección, los gazapos cuentan con anticuerpos capaces de proteger al organismo frente al virus (Marques, 2012). No obstante, la resistencia de los gazapos a la infección por RHDV sugiere la existencia de algún mecanismo adicional capaz de evadir la infección viral, o de modular la respuesta inmune de manera que el virus se elimine sin que el animal sufra daños. Se ha postulado que la aparición de cambios en la estructura del hígado a esta edad pueden ser responsables de la sensibilidad de los individuos adultos al virus (Prieto, 2000). Asimismo, se ha señalado la ausencia de lesiones suficientemente severas como para causar enfermedad visible en los gazapos, como posible mecanismo de resistencia (Mikami, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que existe replicación del virus en las células hepáticas de animales jóvenes, así como una hepatitis de curso lento, acompañada de aumento de las transaminasas hepáticas (Marques, 2010; Abrantes, 2012), por lo que las hipótesis que sugieren ausencia de lesiones pierden validez. No obstante, y al contrario que en adultos, se ha observado que los gazapos muestran regeneración de las áreas lesionadas a partir de 7 dpi (Marques, 2012), compensando el daño hepático de forma temprana.

Respecto a los infiltrados inflamatorios en las áreas de necrosis hepática, se ha observado que los gazapos muestran un predominio de infiltrados de linfocitos, que se sitúan en las proximidades de las células sanas, lo que sugiere la expresión de complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de las células funcionales (Abrantes, 2012). Por el contrario, en los adultos, el infiltrado está formado fundamentalmente por neutrófilos y macrófagos, que se sitúan rodeando las células dañadas, probablemente como respuesta a las lesiones celulares y con el objetivo de su eliminación del tejido (Abrantes, 2012; Ferreira, 2004). Estudios de infección sobre animales jóvenes y adultos muestran que éstos experimentan una importante depleción de linfocitos T (Ferreira, 2006), acompañada de disminución del número de macrófagos (Alonso, 1998), células NK y células dendríticas, tras la infección. Se ha descrito un incremento en la cantidad de CK proinflamatorias TNF α e IL-6, que podría ser responsable de la importante reacción inflamatoria derivada de la infección. Esta acción aparece acompañada de un incremento en las CK antiinflamatorias IL-10 y TGF β , cuya función

parece ser la compensación del estado inflamatorio en el organismo. Sin embargo, la liberación masiva de CK proinflamatorias (Marques, 2012), no consigue ser compensada por sus antagonistas, por lo que el resultado final es la lesión de los tejidos y, posiblemente, la contribución a la necrosis hepática debido a la toxicidad de las CK (Teixeira, 2012). Estos estudios apuntan a la existencia de mecanismos de patogenicidad adicionales al efecto directo del virus sobre los tejidos. En concreto, el efecto hepatotóxico de las CK podría ser un elemento determinante en la apoptosis de los hepatocitos, contribuyendo a la severidad del cuadro clínico en adultos (Marques, 2014). Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en estudios de inmunosupresión en gazapos, en los que se observa cómo los animales que reciben metilprednisolona experimentan un cuadro clínico similar al producido por el virus en animales adultos. La hepatitis fulminante en estos animales, aparece acompañada de un importante incremento de las CK (Marques, 2014), sugiriendo la implicación de estas moléculas en la patogenia de la enfermedad.

3.4.7.2 Papel de los HBGAs en la resistencia a la infección

El término HBGA procede de las siglas en inglés *Histo-blood group antigens*. Los HBGAs son carbohidratos complejos que se encuentran unidos a proteínas o a lípidos presentes en la superficie de ciertas células, como los glóbulos rojos humanos, las células epiteliales, la mucosa intestinal y la tráquea. También se encuentran en forma de oligosacáridos libres en fluidos biológicos tales como la saliva, la leche, la sangre y el mucus intestinal (Nyström, 2011; Abrantes, 2012; Pinheiro, 2015). La síntesis de los HBGA se realiza a partir de un precursor unido a un residuo de galactosa. La enzima α -1,2-fucosiltransferasa cataliza la unión del precursor a un residuo de fucosa, dando lugar al antígeno H. La adición de una molécula de n-acetil-galactosamina a la posición α -1,3 del residuo de galactosa del antígeno H, dará lugar al antígeno A, mientras que la adición en esa misma posición de una molécula de galactosa, dará lugar al antígeno B (Ruvöen-Clouet, 2000; Nyström, 2011; Leuthold, 2015). Este proceso se lleva a cabo bajo la regulación de los 3 genes rFut1, rFut2 y rSec1, que muestra escasa actividad en lepóridos (Strive, 2013; Nyström, 2015; Pinheiro, 2015).

Se ha determinado que el RHDV, a través del subdominio P de la cápside, se une a este tipo de glicanos fucosilados durante la infección celular. La expresión de los HBGA en el conejo se ha estudiado con especial interés en la tráquea e intestino, ya que son vías de entrada del RHDV al organismo, así como en hígado, debido a su interés como lugar de

replicación viral (Nyström, 2011). En esta especie se ha descrito la existencia de cierta variabilidad individual en la presencia de antígenos A/B/H en el duodeno; estas variaciones podrían ser el resultado de diferencias en el nivel de expresión de los genes que los codifican, y podrían estar implicados en la inmunidad frente al RHDV (Hukowska, 2013). La expresión de los genes rFut1 y rFut2 en el intestino delgado del conejo es homogénea. Sin embargo, los niveles de expresión de rSec1 son variables entre animales, por lo que se considera que un incremento en su expresión puede tener implicaciones en la intensidad de unión del virus a la mucosa intestinal (Nyström, 2015). Si bien las funciones de estos genes no son completamente conocidas, se ha determinado que el gen rSec1 regula la expresión de rFut1, disminuyendo su efecto. Puesto que la actividad de rFut1 está relacionada con la creación de lugares de unión al virus, es presumible que los animales con una mayor expresión de rSec1 muestren un menor número de sitios de unión y sean, por lo tanto, más resistentes a la infección (Nyström, 2015).

Estudios de unión del virus a HBGAs han demostrado que existe cierta especificidad entre las cepas y los factores de unión A/B/H. No obstante, el grado de afinidad del virus y los HBGA no sólo depende de su especificidad, sino que la accesibilidad de los antígenos y el grado de expresión de los mismos, son factores que influyen en la infección. A pesar de que los HBGA se encuentran en la superficie de las células, se ha observado que existen diferencias en la longitud de estos glicanos, que producen una mayor exposición de algunos de ellos sobre la superficie celular. De este modo, antígenos que se encuentran en mayor proporción, pero que muestran una longitud inferior al resto, podrían experimentar una menor unión viral, a pesar de estar expuestos a una cepa afín. Por otro lado, en circunstancias de escasa expresión de antígenos específicos de la cepa infectiva, se ha observado que el virus es capaz de causar enfermedad, sólo si se encuentra en dosis elevadas. No obstante, las tasas de supervivencia de estos animales, cuyo perfil HBGA no es específico para la cepa, han mostrado ser mayores de lo esperado para dicha cepa. Sin embargo, cuando la dosis viral es baja, el virus es capaz de infectar a los animales pero no de producir enfermedad, independientemente de su patogenicidad (Nyström, 2011). Estas observaciones coinciden con las obtenidas en estudios de norovirus, que determinan la imposibilidad de una cepa determinada para causar enfermedad en toda una población (Nyström, 2015) y que apuntan al polimorfismo genético como elemento clave en la inmunidad poblacional (Fouchet, 2009; Nyström, 2011).

3.5 Diagnóstico laboratorial

3.5.1 Métodos de detección del virus

El RHDV se encuentra en grandes cantidades en hígado y bazo de los animales infectados. Se ha determinado que una suspensión al 10% de tejido hepático contiene 10^3 - $10^{6.5}$ DL₅₀/ml. Por este motivo, ambos tejidos orgánicos se utilizan de forma rutinaria en el diagnóstico de la enfermedad. La ausencia de cultivos celulares que permitan el estudio del virus y sus características de patogenicidad, hace imprescindible la realización de estudios in vivo como método de evaluación de la virulencia de las cepas. No obstante, el diagnóstico rutinario de la enfermedad no precisa este tipo de estudios, ya que existen diversas técnicas laboratoriales que permiten detectar la presencia de antígeno viral en los tejidos, con gran sensibilidad y especificidad. La primera técnica que se utilizó para detectar el virus fue la HA²⁸ (Parra, 1990; Capucci, 1991; Gregg, 1992). Esta técnica se basa en la capacidad del virus de aglutinar eritrocitos humanos y se ha utilizado de forma tradicional como método de titulación del virus. En la actualidad su uso es menos frecuente debido a la existencia de técnicas más sencillas, rápidas y específicas. Los ensayos ELISA²⁹ comenzaron a desarrollarse poco tiempo después de la aparición del virus y tomaron importancia debido a su sensibilidad y especificidad (Rodák, 1990; Capucci, 1991; Collins, 1995; Collins, 1996; Nardelli, 1996; Cooke, 2000). En la actualidad, existen kits comerciales específicos para la detección del RHDV, y es la técnica diagnóstica recomendada. Cuando la HA o el ELISA ofrecen resultados poco concluyentes, es posible obtener resultados diferenciales mediante Western Blotting (Ruvoen-Clouet, 1995a,b; Le Gall, 1992).

La detección de ácidos nucleicos del virus mediante RT-PCR y qRT-PCR (Guittre, 1995; Guittre, 1996; Duarte, 2015) ofrece la ventaja de una mayor sensibilidad y rapidez (Vende, 1995). Se ha determinado que esta técnica es capaz de detectar 5-10 copias del genoma por mg de tejido (Guitre, 1995; Gould, 1997; McColl, 2002), incrementando considerablemente la capacidad de detección del virus frente a todas las técnicas anteriores. Estos métodos permiten diferenciar de forma rápida la infección por RHDV y por RHDVb (Sarto, 2013; Duarte, 2015; Dalton, 2015). Por último, es posible observar la presencia del virus en los tejidos mediante microscopía electrónica (EM³⁰) (Biermann, 1992; Capucci, 1991; Le Gall, 1992). La tinción negativa (Lavazza, 2015), así como la IEM³¹ (Valicek, 1992;

²⁸ Hemaglutinación

²⁹ De sus siglas en inglés: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

³⁰ De sus siglas en inglés: *Electron Microscopy*

³¹ De sus siglas en inglés: *Immunoelectron Microscopy, Inmuno-Microscopía Electrónica*

Lavazza, 2015) son técnicas utilizadas para la observación directa de las partículas virales. La inmunotinción, con o sin fluorescencia, permite observar lesiones celulares específicas indicativas de infección por el RHDV (OIE, 2015; OIE, 2016).

3.5.2 Métodos de detección de anticuerpos específicos

La detección de anticuerpos específicos frente al virus permite valorar la producción de una respuesta inmune, por lo que resulta útil en estudios de monitorización del virus en las poblaciones, así como en el control sanitario de las explotaciones. Debido a las diferencias inmunológicas entre RHDV/RHDVa y RHDVb, es necesaria la utilización de pruebas específicas para confirmar o descartar la infección por cada uno de los virus. La primera técnica utilizada para la determinación de anticuerpos frente al RHDV fue la IHA³² (Gregg, 1992). Este método, al igual que la HA, se basa en la capacidad hemaglutinante del virus frente a los eritrocitos humanos. Es la técnica más sencilla, si bien su especificidad ha sido superada por las técnicas ELISA indirecto y de competición (Liu, 2012a,b). Este método ofrece una mayor rapidez, lo que resulta una importante ventaja cuando el número de muestras es elevado.

3.6 Profilaxis sanitaria

3.6.1 Medidas higiosanitarias y de control

Las principales medidas dirigidas a evitar la difusión de la enfermedad son el control de las importaciones en áreas donde la enfermedad no se ha detectado, la cuarentena previa a la entrada de animales nuevos en las explotaciones, y el aislamiento de animales sospechosos de portar el virus (OIE, 2015). En el caso de detectarse un brote, existen protocolos específicos de actuación, que deben seguirse detalladamente para controlar el brote tan pronto como sea posible (MAPAMA, 2014). Asimismo, es fundamental la existencia de programas de vacunación adaptados a cada caso (tipo de sistema de explotación o animal de compañía) tanto frente al RHDV como frente al RHDVb (Boucher, 2015). Esta medida es recomendable a pesar de que no se hayan notificado brotes recientes en la zona (Westcott, 2015; McGowan, 2016), así como en áreas donde el riesgo de transmisión de los conejos silvestres a los domésticos sea especialmente elevado (Rocchi, 2016). Las autoridades sanitarias podrán elaborar el protocolo vacunal más conveniente para cada región (OIE, 2015). En los países donde no existan vacunas comerciales frente a la enfermedad y se precise la importación de las mismas, este proceso debe llevarse a cabo según la legislación vigente. Si las autoridades

³² Inhibición de la Hemaglutinación

sanitarias lo permiten, la decisión sobre la vacunación puede seguir el criterio del veterinario responsable (Meredith, 2013; Tung, 2015; VVAAc, 2016; VVAA, 2016a; VVAAb, 2016); el veterinario será también el responsable de la toma de decisiones en los países donde la vacunación sea voluntaria (Burmakina, 2016).

Algunos estudios recomiendan sólo la vacunación de animales cuyo estado sanitario es conocido, puesto que la aplicación generalizada de vacunas no ofrece ventajas sobre la supervivencia de los animales (Calvete, 2004; Rouco, 2016). La influencia de los factores individuales (parasitosis, enfermedades concomitantes, estado fisiológico) es determinante en la efectividad de la vacunación, por lo que, en condiciones ideales, deberá llevarse a cabo considerando dichos parámetros.

3.6.2 Situaciones de emergencia sanitaria

Se considera emergencia sanitaria la aparición de brotes de enfermedad, especialmente en áreas donde la situación inmunitaria es desconocida. Se trata de una situación crítica que es necesario solucionar en el menor tiempo posible, por lo que se ponen en marcha protocolos de emergencia regulados por el MAPAMA (MAPAMA, 2014). Ante la aparición de brotes de RHDV en áreas donde la vacunación es ausente o dudosa, es conveniente vacunar a los animales frente al virus (Donnolly, 2013). Este tipo de vacunación es capaz de controlar los brotes de RHDV en 7-9 días, y los brotes de RHDVb en 7-15 días (Le Gall-Reculé, 2011).

Además de la utilización de vacunas, se ha demostrado experimentalmente la eficacia de la inmunidad pasiva. La aplicación de suero hiperinmune procedente de conejos que han superado la enfermedad, o bien de gazapos expuestos al RHDV, resulta eficaz, si bien la inmunidad que se crea es menos duradera que la obtenida mediante la vacunación (Huang, 1991; Ferreira, 2008).

3.6.3 Vacunación sistemática

El método más eficaz para controlar la difusión del virus es la aplicación sistemática de vacunas frente al RHDV y al RHDVb tanto en las explotaciones como a los animales de compañía. Existen varias vacunas comerciales que protegen frente a cada uno de los virus, así como vacunas bivalentes, cuyas características (duración de la inmunidad, vía de aplicación, dosis, edad recomendada) son especificadas por el laboratorio correspondiente y deben ser aplicadas para optimizar la eficacia del producto.

Las vacunas monovalentes existentes en la actualidad, son vacunas elaboradas a partir de tejido hepático de conejos infectados experimentalmente con el virus, inactivadas y adyuvantadas. Este tipo de vacunas se aplica de forma rutinaria en las explotaciones y animales de compañía, donde la pauta indica la necesidad de revacunaciones periódicas para incrementar la respuesta inmunitaria de los animales (Berninger, 1995). Sin embargo, ningún tipo de vacuna ha podido evitar la difusión de la enfermedad en el medio ambiente, debido a la imposibilidad de su aplicación en conejos silvestres. Si bien es cierto que se han desarrollado vacunas capaces de transmitirse de forma horizontal entre animales, así como de aplicación vía oral o nasal, en la práctica este tipo de vacunas sólo se han utilizado de forma experimental. El elevado coste de su producción, los problemas derivados del manejo de animales silvestres y el reducido efecto de estas vacunas, son algunos de los motivos por los que, en la actualidad, no resulta posible la vacunación de conejos silvestres a gran escala (Abrantes, 2012).

La vacuna bivalente por excelencia, en el caso del conejo, inmuniza frente al RHDV y el virus de la mixomatosis. Puesto que ambas enfermedades han causado graves daños en las poblaciones, la elaboración de esta vacuna es un hecho a destacar (Bertagnoli, 1996a,b; Calvete, 2004; Spibey, 2012; Selleri, 2014). Estas vacunas suelen incluir el virus de la mixomatosis atenuado y expresan la proteína de la cápside del RHDV (VP60). No obstante, existen vacunas que incluyen el virus del fibroma de Shope en lugar del virus mixoma atenuado (Spibey, 2012). Además de su aplicación rutinaria en las explotaciones y en conejos de compañía, este tipo de vacunas se han testado en conejos silvestres (Torres, 2000; Torres, 2001) con el objetivo de lograr su transmisión horizontal por contacto directo (Calvete, 2004) o bien a través de la picadura de pulgas (Bárcena, 2000). Este tipo de procedimientos, aun en estudio, podrían mejorar enormemente la situación epidemiológica de ambas enfermedades en el campo. De forma simultánea se han desarrollado vacunas bivalentes frente a la pastereiosis y la enfermedad hemorrágica (Peshev, 2003). A pesar de que la pastereiosis es una enfermedad de menor gravedad que la mixomatosis, es endémica en algunas explotaciones, por lo que su aplicación es también interesante. Estudios de inmunidad de esta vacuna frente a las vacunas monovalentes, muestran que la respuesta inmune elaborada por los animales es más potente en el caso de la vacuna bivalente (Peshev, 2003).

3.6.4 Tratamiento de la enfermedad

En la actualidad, no existe tratamiento médico para la enfermedad provocada por el RHDV y el RHDVb. En el caso de animales domésticos que se consideran mascotas, se ha descrito la posibilidad de aplicar un tratamiento de soporte, si bien las garantías de éxito son limitadas (Donnelly, 2013). Debido al elevado coste y las escasas posibilidades de supervivencia, este tipo de tratamientos no se aplican en animales de producción. En casos de emergencia sanitaria, la vacunación de emergencia es la única medida aplicable.

VI. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad Hemorrágica del Conejo es una enfermedad infecciosa de origen vírico, que afecta a los conejos silvestres y domésticos, provocando un cuadro clínico grave y, en la mayoría de los casos, letal. El agente etiológico de la enfermedad es un calicivirus del género *Lagovirus*, denominado RHDV (*Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*). Este virus está filogenéticamente relacionado con otros calicivirus de patogenicidad baja o media, así como no patógenos, denominados de forma amplia RCV (*Rabbit Calicivirus*) y con el virus que provoca el Síndrome de la Liebre Parda Europea (EBHSV-*European Brown Hare Syndrome Virus*), que muestra en la liebre un curso clínico y patogenia similares al producido por el RHDV en el conejo. La forma clásica de la enfermedad se caracteriza por afectar a conejos adultos, a los que coloniza con gran eficacia por contacto directo (vía oronasal y conjuntival), a través de fómites (materiales de trabajo, pelo o piel de animales infectados, heces o cadáveres) y mediante vectores (mosquitos, pulgas), causando un cuadro agudo de gran severidad. A pesar de que la aparición de brotes de enfermedad se controló de forma eficaz mediante la vacunación, en 2010 se describió una nueva variante de este virus, que se denominó RHDVb. Este virus se halla muy relacionado con los genogrupos descritos en el pasado y muestra similitudes con los mismos. Sin embargo, la principal diferencia que presenta y que constituyó un grave problema sanitario, fue la afinidad que mostraba por los gazapos. El establecimiento de una nueva población diana para el virus, implicó la ineficacia de las vacunas existentes, así como de los calendarios vacunales en vigor hasta entonces. Por estos motivos, se puso en marcha un sistema de vacunación de emergencia, en el que las nuevas vacunas se producían a partir de animales infectados con la variante del virus, aun muy desconocido. Tras el estado inicial de incertidumbre que se produjo con la aparición del nuevo brote y nos centramos en evaluar una nueva vacuna frente a la variante b de la Enfermedad Vírica Hemorrágica, cuyo objetivo fue inmunizar gazapos recién destetados.

La realización de esta Tesis Doctoral se inició con un estudio sobre la eficiencia vacunal en animales de experimentación mediante realización de un desafío frente a 4 aislados virales de RHDVb, obtenidos en España en 2014. Durante el período experimental, se realizó una toma de muestras y monitorización exhaustiva de los animales, con el objetivo de obtener datos sobre la patogenia de la enfermedad y el desarrollo de la respuesta inmune frente al virus. El diagnóstico laboratorial de la enfermedad se llevó a cabo utilizando el método oficial recomendado (ELISA-DAS), a partir de muestras de hígado. Los resultados de esta prueba se utilizaron como control frente a una prueba diagnóstica rápida de tipo inmunocromatográfico, de reciente aparición en el mercado, cuyas ventajas e inconvenientes

en el uso a nivel de campo se decidió evaluar de forma paralela. Con el objetivo de analizar la Respuesta Inmune producida por los diferentes grupos de animales, se utilizaron muestras de suero para estudiar la producción de anticuerpos específicos frente al virus utilizando un método tradicional de detección (Inhibición de la Hemaglutinación), así como la producción de IFN γ post-infección, y se evaluaron ambos parámetros en los diferentes grupos de animales. Como método complementario de diagnóstico, además de la evaluación clínica, el diagnóstico presuntivo y los datos laboratoriales, se llevó a cabo un análisis anatomopatológico exhaustivo. El estudio macroscópico de los órganos se realizó de forma sistemática, y se tomaron muestras de hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, corazón, linfonódulos (mesentéricos, mediastínicos, poplíteos), timo, glándula adrenal y encéfalo de los animales, en busca de alteraciones debidas a la infección. Los datos clínicos, macroscópicos e histológicos se analizaron con el objetivo de describir el desarrollo de la infección en cada uno de los grupos, así como de comprender las diferencias en la patogenicidad de los diferentes aislados del virus.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el análisis de la patogenicidad de la nueva variante de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo (RHDVb). Además, los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral han sido:

- Evaluar la eficacia de una nueva vacuna frente a la variante b de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo en animales recién destetados, y comparar la protección que proporciona frente a 4 aislados de RHDVb.
- Determinar los posibles efectos adversos de la vacunación y su relevancia clínica.
- Analizar la producción de anticuerpos específicos y de IFN γ en gazapos, tanto vacunados como no vacunados, enfrentados a una infección experimental con el RHDVb.
- Evaluar, a partir de los datos anteriores, la Respuesta Inmune desarrollada por los animales, así como su efecto sobre el desenlace de la enfermedad.
- Realizar un estudio clínico y anatomopatológico de los 4 aislados virales.
- Determinar las diferencias en la patogenicidad de los 4 aislados.

VII. RESULTADOS

Capítulo 1. Evaluación de una nueva vacuna frente a la variante b del virus de la enfermedad hemorrágica en gazapos

1.a Resumen

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) está producida por un calicivirus que afecta a conejos adultos, en los que provoca una enfermedad de curso generalmente agudo, alcanzando tasas de morbilidad del 100% y tasas de mortalidad que oscilan entre el 40 y el 100%. Los conejos afectados por el virus experimentan signos clínicos de tipo inespecífico tales como fiebre, apatía, anorexia y congestión de las membranas mucosas, que se agravan en pocas horas dando lugar a una intensa sintomatología nerviosa. Los signos que se pueden observar en esta fase de la enfermedad son ataxia, postración, vocalizaciones y convulsiones, y los animales mueren de forma súbita poco tiempo después. Entre las alteraciones orgánicas que se encuentran en estos animales destaca la presencia de una marcada hepatomegalia y esplenomegalia, acompañadas de otros signos viscerales como edema pulmonar, congestión vascular, petequias, hemorragias, ascitis y hemotórax. El RHDVb es la nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y produce una enfermedad de curso similar en los gazapos, resistentes al RHDV. El virus coloniza los órganos, especialmente el hígado, bazo, riñones e intestino y provoca alteraciones hemodinámicas y necrosis hepática, letal en la mayor parte de los casos. La aparición de brotes de RHDV se ha controlado eficazmente mediante el uso de vacunas inactivadas. Estas vacunas, obtenidas a partir de suspensiones hepáticas de conejos infectados experimentalmente con el virus, resultan efectivas tanto en la prevención de la enfermedad como en la vacunación de emergencia. Sin embargo, la ausencia de protección cruzada entre el RHDV y el RHDVb, debida a diferencias genéticas y antigénicas entre ambos virus, provocó la ineficacia de las vacunas existentes frente a la nueva enfermedad. Por este motivo, surgió la necesidad de elaborar nuevas vacunas capaces de proteger a los gazapos frente al nuevo virus, tan pronto como la inmunidad maternal hubiera disminuido, ya que los animales menores de 40 días son especialmente susceptibles. En este estudio se evalúan los efectos de una nueva vacuna comercial frente al RHDVb en gazapos de 28 días. Con el objetivo de determinar si la efectividad de dicha vacuna puede proteger a los animales frente a diferentes cepas del virus, los animales fueron infectados experimentalmente con 4 aislados virales. Nuestros resultados muestran que la

vacuna induce protección en el 80-100% de los casos, lo que sugiere que la aplicación de esta vacuna en animales jóvenes es un método eficaz de prevención de la enfermedad.

1.b Abstract

Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) is a disease caused by a calicivirus which infects adult rabbits and leads to acute disease. RHD spreads rapidly, causing morbidity rates of 100% and mortality rates of 40-100%. Infected rabbits show unspecific signs such as fever, apathy, anorexia and mucosal congestion, which increase during the first few hours. Later on, neurological symptoms, such as ataxia, prostration, groaning and seizures appear. Sudden death occurs within the first 12-96 hours post-infection. The animals show severe hepatomegaly and splenomegaly, lung oedema, vascular congestion, petechiae, haemorrhages, ascites and haemothorax. RHDVb is a new variant of RHDV and is responsible for causing an acute disease in young rabbits. The virus invades internal organs, especially the liver, spleen, kidneys, and gut; prevents coagulation; and causes liver necrosis. This eventually leads to quick death of the animal because of hemorrhages. RHDV outbreaks have been controlled through vaccination using inactivated vaccines. These products are made from liver suspensions obtained from experimentally infected rabbits, and they are effective to prevent the infection and also for emergency vaccination. However, the lack of cross-protection between RHDV and RHDVb due to genetic and antigenic differences among both viruses, led to the inefficacy of the current vaccines against the new disease. Thus, the necessity of new vaccines against RHDVb for use in rabbit kittens became urgent. These vaccines should be applicable on animals younger than 40 days, since it is the window of infection for the virus. In this study, we evaluated the effects of a new vaccine against RHDVb in 28 days old rabbits. Our aim was to assess whether the vaccine was able to protect young rabbits against 4 different viral strains. Our findings show that the vaccine had a protective effect with survival rates reaching 80–100% for the different isolates. These results suggest that this vaccine, when applied to young animals, is an effective tool to protect against the disease caused by RHDVb in rabbitries.

2. Introducción

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo se describió en China en 1984 (Liu, 1984) como resultado de la importación de animales vivos desde Europa, y se diseminó de forma rápida entre los animales adultos, alcanzando tasas de morbilidad del 100% y de mortalidad del 40-100% (Henning, 2005). El agente etiológico de la enfermedad es un virus

ARN de polaridad positiva y sin envoltura, perteneciente al el Género *Lagovirus* (Green, 2000), incluido en la Familia *Caliciviridae* (Parra, 1990). Este tipo de virus no son cultivables *in vitro*, por lo que el método estándar para el estudio de su patogenicidad es la infección de animales de experimentación. Este virus produce una enfermedad de curso agudo que lesiona gravemente el hígado, bazo, pulmones y riñones (Marcato, 1991; Prieto, 2000). Como consecuencia, se producen alteraciones hemodinámicas y la muerte en 24-96 h (Abrantes, 2012). En 2010 se describió un nuevo virus relacionado con el RHDV (Dalton, 2012; Le Gall-Reculé, 2011), que producía una enfermedad similar en los gazapos menores de 40 días, con tasas de mortalidad de hasta el 80% (Le Gall-Reculé, 2011). Este hallazgo resulta de gran importancia desde el punto de vista de la producción animal, así como en las poblaciones silvestres, puesto que el conejo es la presa fundamental de ciertos depredadores mediterráneos, como el lince ibérico, un recurso cinegético de gran interés y una fuente de proteína tradicional en la cultura mediterránea. Por estos motivos, es fundamental el control de los brotes y de la difusión de la enfermedad, que puede causar graves daños en el ecosistema e importantes pérdidas productivas (Alda, 2010).

Las primeras vacunas que se elaboraron frente al RHDV fueron vacunas fabricadas a partir de tejidos (hígado, bazo, riñón, pulmón) de animales infectados por el virus (Xu, 1989; Rodák, 1990). Se trataba de vacunas inactivadas mediante formaldehído (Xu, 1989), por lo que el virus se encontraba inactivo, pero las propiedades inmunológicas del mismo permanecían intactas (OIE, 2015). Este tipo de vacunas era capaz de producir anticuerpos en 5 días, y la inmunidad duraba hasta 3 semanas (Smid, 1991). Las primeras etapas en la fabricación de vacunas frente al RHDV fueron de gran importancia, ya que consiguieron controlar los brotes de una enfermedad que aun era poco conocida (Gorski, 1994). A partir de este momento, el interés en la fabricación de vacunas consistió en incrementar su eficacia, por lo que se realizaron ensayos con diferentes mecanismos de inactivación y distintos agentes adyuvantes. Se demostró que la inactivación de los tejidos con formalina y su adyuvantado con agentes oleosos, producía una inmunidad de larga duración, hasta 3-4 meses (Huang, 1991). Por otra parte, la inactivación con β -propiolactona y el adyuvantado con AIOH también resultó un mecanismo eficaz de protección (Capilla, 1998) y, al igual que el formaldehído, mantiene las propiedades inmunogénicas del virus (OIE, 2015). Sin embargo, la protección que conferían las vacunas que incluían un adyuvante oleoso continuaba siendo más eficaz que aquella inducida por vacunas adyuvantadas con AIOH (Capilla, 1998).

Este tipo de vacunas, consideradas de primera generación (Yang, 2015) han resultado útiles durante décadas debido a la facilidad de fabricación y aplicación y su bajo coste. Sin embargo, existen riesgos derivados de su elaboración, que requiere el manejo de partículas infecciosas fácilmente difundibles y la gestión de residuos muy contaminantes. Asimismo, las implicaciones éticas derivadas de su fabricación cuestionan los principios de bienestar animal, por lo que el desarrollo de mecanismos alternativos de elaboración de vacunas resulta prioritario (Abrantes, 2012).

Por este motivo, se han desarrollado varios tipos de “vacunas experimentales”, es decir, vacunas cuya eficacia ha sido comprobada, pero que no han sido probadas en condiciones no experimentales. En su mayor parte, se trata de vacunas de segunda generación, es decir, vacunas que expresan la proteína de la cápside (VP60) en diferentes sistemas (Yang, 2015), aunque algunas de ellas incorporan estimulantes de la respuesta inmune. Entre estas últimas, destacan las vacunas de primera generación adyuvantadas con componentes alternativos, como TPPPS³³ y APS³⁴, conocidos en la medicina oriental por su capacidad para estimular la inmunidad (Wei, 2011). La inmunización a partir de IgY recombinante de origen aviar también se ha descrito (Li, 2014) aunque el excesivo manejo necesario de los animales que requieren estas vacunas para ser efectivas, las hace poco apropiadas para su uso.

Entre los métodos genéticos utilizados se encuentra la expresión de la proteína VP60 en bacterias como *E. coli* (Boga, 1994a,b; Viaplana, 1997; Machín, 2001; Guo, 2016) o *Salmonella typhimurium* (Qiu, 2013) y en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Boga, 1997) y *Pichia pastoris* (Farnós, 2005; Farnós, 2006; Farnós, 2009; Fernández, 2013; Fernández, 2015), cuyos productos de síntesis resultan inmunógenos y protegen frente a la infección por el RHDV en condiciones experimentales. La síntesis de los virus recombinantes Vaccinia-RHDV (Bertagnoli, 1996), Canarypox-RHDV (Fischer, 1997), Parapoxvirus-RHDV (Rohde, 2011), Adenovirus (Fernández, 2011; Wang, 2012) y otras quimeras como FCV³⁵-RHDV o Influenza A-RHDV (Luque, 2012; Moreno, 2016) han sido igualmente testadas de forma experimental, con resultados positivos en cuanto a la inmunidad.

La expresión de la proteína VP60 en plantas transgénicas ha sido uno de los objetivos de la investigación vacunal frente a esta enfermedad. La ventaja que supondría una vacuna de aplicación oral, tanto en animales domésticos como silvestres, ha provocado el desarrollo de

³³ *Taishan pinus massoniana pollen polysaccharide*

³⁴ *Astragalus polysaccharide*

³⁵ De sus siglas en inglés: *Feline Calicivirus*

diversas opciones (Fernández, 2001; Gil, 2006; Mikschofsky, 2009), de las cuales, la más utilizada es la planta de la patata (Castañón, 1999; Martín-Alonso, 2003; Mikschofsky, 2011). Si bien su vía de aplicación supone una ventaja al disminuir el manejo de los animales y poder administrarse en animales silvestres, el nivel de expresión de la proteína es aún insuficiente para poder considerar su uso (Castañón, 1999; Gil, 2006).

A pesar de la variedad de técnicas desarrolladas, el método más utilizado para la síntesis de VLPs ha sido el sistema de expresión de VP60 en baculovirus, en cultivo de células de insecto, tanto frente al RHDV (Laurent, 1994; Nagesha, 1995; Marín, 1995; Planadurán, 1996; Gromadzka, 2006; Gao, 2013; Chen, 2014; Yang, 2015) como frente al RHDVb (Bárcena, 2015; DeSheng, 2015). Estudios más recientes sustituyen el cultivo celular por larvas (Pérez-Filgueira, 2007) y pupas (Zheng, 2016), obteniendo resultados de 1000 dosis vacunales / unidad larvaria o pupa, con duración de la inmunidad de 180/360 días (sin/con adyuvante), lo que supondría una gran ventaja económica en su producción.

Recientemente se ha desarrollado una tendencia a la elaboración de vacunas de ADN recombinante. Si bien es cierto que las vacunas con VLPs parecen un producto seguro, ya que no tienen material genético que pueda producir infección, y efectivo, puesto que inducen una inmunidad humoral y celular apropiadas, su escaso nivel de expresión y las consideraciones sobre liberación de OMGs³⁶ al medio, sugieren la necesidad de explorar nuevas vías de síntesis (Crisci, 2009; Yuan, 2013; Cheng, 2013). Las vacunas de ADN prometen un mayor nivel de seguridad, lo que supone una ventaja en su aplicación en animales inmunocomprometidos, así como mayor estabilidad. Sin embargo, su desarrollo aun se encuentra en proceso (Yuan, 2013).

En resumen, a pesar de las diferentes vacunas de segunda generación que se han desarrollado, su escaso nivel de expresión o la necesidad de elevadas dosis del producto para conseguir niveles de inmunidad adecuados impiden su uso como medida terapéutica estándar. Por ello, las vacunas frente al RHDV que se utilizan en la actualidad, continúan siendo vacunas de primera generación, elaboradas a partir de tejido hepático de animales infectados experimentalmente frente al virus e inactivadas, que confieren a los animales la protección necesaria. No obstante, estas vacunas no resultan eficaces frente al RHDVb, debido a las diferencias antigénicas entre ambos virus (Dalton, 2012), por lo que el desarrollo de vacunas específicas capaces de proteger frente a la nueva enfermedad, es una necesidad urgente. Por

³⁶ Organismos Modificados Genéticamente

este motivo, se desarrollaron nuevas vacunas basadas en el mismo método de fabricación, utilizando aislados virales de los nuevos brotes de RHDVb. Sin embargo, la eficacia de estas vacunas en la prevención de la enfermedad a una edad temprana y frente a diferentes cepas del virus, debía ser testada. En este estudio se evaluaron los efectos de una nueva vacuna frente al RHDVb en gazapos enfrentados a 4 aislados del virus, con el objetivo de determinar la efectividad frente a cada uno de ellos, así como los posibles efectos adversos derivados de una vacunación precoz.

3. Material y métodos

3.1 Experimentación animal

La experimentación animal se llevó a cabo acorde con la legislación vigente en materia de experimentación animal. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Animales de Experimentación de la Universidad Complutense de Madrid, el Comité de Ética del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y la División de Protección Animal de la Comunidad de Madrid.



Figura 8. Mantenimiento de los animales durante el período experimental

Los animales seleccionados para este estudio fueron 54 hembras no vacunadas de 28 días, procedentes de una explotación cuyos protocolos sanitarios son conocidos. Todos los animales fueron identificados a su llegada mediante marca auricular, y se tomaron medidas sobre su peso, temperatura corporal y estado sanitario general. Durante todo el período experimental los animales se alimentaron de pienso comercial y heno *ad libitum*, y contaban con agua, también a libre disposición (Fig. 8). Puesto que el estudio tuvo lugar en instalaciones NCB3³⁷, todos los parámetros ambientales (humedad, temperatura, circulación de aire) eran estables. El estado de salud de los animales, así como la cantidad de alimento y agua disponible eran comprobados dos veces al día por el mismo personal, y la limpieza de

³⁷ Nivel de Contención Biológica 3

las jaulas se realizaba siempre que fuera necesario. La monitorización de los parámetros fisiológicos de los animales, así como la toma de muestras de sangre se llevaron a cabo por profesionales especializados, y se realizó a días alternos, con el objetivo de disminuir en lo posible el manejo. Durante este estudio, se prestó especial atención al bienestar animal.

3.2 Preparación de la vacuna

La vacuna utilizada en este estudio está producida a partir de tejido hepático de conejos infectados experimentalmente con el RHDVb. Se trata de una vacuna comercial, inactivada de forma térmica, y adyuvantada con hidróxido de aluminio. Las indicaciones del fabricante sugieren su aplicación por vía subcutánea, a dosis de 1mL por animal y su conservación a temperaturas de 4-8°C. Antes de la aplicación, se recomienda la homogenización del producto.

3.3 Preparación de los inóculos virales

Los aislados virales utilizados para la infección procedían de 4 brotes ocurridos en diferentes regiones del Norte de España en el año 2014, y fueron caracterizados como RHDVb. Se realizó una suspensión de tejido hepático en PBS al 10%. y se centrifugó a 500g durante 20 minutos y, posteriormente, a 6000g durante 30 minutos. A continuación se llevó a cabo la titulación de los 4 inóculos mediante HA (OIE, 2015) con eritrocitos humanos del grupo B (Dalton, 2012) y se prepararon 14 alícuotas por cada aislado viral. Los viales se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.4 Procedimiento experimental

Se estableció un período inicial de cuarentena de 4 días, durante los cuales no se detectaron alteraciones sanitarias ni comportamentales. Los animales se distribuyeron al azar en 9 jaulas, agrupados de la siguiente manera: grupos *desafío* 1-4 (7 animales en cada grupo): serían vacunados y posteriormente infectados con los aislados 1-4; 4 grupos *control* (5 animales en cada grupo): serían infectados con los aislados 1-4; 1 grupo *vacunal* (6 animales): serían vacunados.

El día 0 se procedió a la vacunación de los 12 animales pertenecientes a los grupos *vacunal* y *desafío* 1-4. Tras atemperar la vacuna, se aplicó de acuerdo a las condiciones indicadas por el fabricante (dosis de 1 mL, vía subcutánea). A los animales de los grupos *control* 1-4 se les inyectó por la misma vía 1 mL de solución salina fisiológica. Se tomaron

muestras de sangre de la vena auricular periférica de todos los animales, y se midieron su peso y temperatura. El estado sanitario general de los animales era bueno y no se observaron alteraciones en su comportamiento. Durante los días 0-7, los animales fueron monitorizados con el objetivo de evaluar posibles efectos derivados de la aplicación de la vacuna, tomando como control los valores obtenidos durante la cuarentena. La monitorización del peso (Tabla VI, VII) y la temperatura, la toma de muestras de sangre, y la revisión de su estado general y del punto de vacunación, se realizaron a días alternos (Fig. 9). El día 7, los animales incluidos en los grupos *desafío* 1-4 y *control* 1-4 fueron infectados con el aislado viral correspondiente (dosis de 1mL, vía intramuscular). A los animales del grupo *vacunal* se les aplicó por la misma vía 1 mL de solución salina fisiológica. A partir del día 7, los animales se monitorizaron a diario con el objetivo de observar los efectos del virus. Se tomaron muestras de sangre y se midieron el peso y temperatura de los animales a días alternos. La comprobación de su estado sanitario y de su comportamiento, se llevó a cabo a diario.

Tabla VI. Peso medio inicial de los diferentes grupos

GRUPO	PESO MEDIO GRUPO
<i>Control 1</i>	671,3
<i>Control 2</i>	596,3
<i>Control 3</i>	612,3
<i>Control 4</i>	645
<i>Desafío 1</i>	567,5
<i>Desafío 2</i>	652,5
<i>Desafío 3</i>	630
<i>Desafío 4</i>	660
<i>Vacunal</i>	649,2

La aparición de síntomas de la enfermedad en los animales, tales como fiebre superior a 41°C, postración o signos nerviosos, así como la presencia de otras alteraciones de su estado fisiológico que disminuyeran notablemente su calidad de vida, se consideraron motivo de eutanasia humanitaria. Al final del período experimental, los animales que sobrevivieron a la infección fueron eutanasiados mediante sobredosis de barbitúricos, previa sedación. Se realizó la necropsia de todos los animales con objetivos diagnósticos y de toma de muestras para su

posterior estudio. Asimismo, se realizó un análisis inmunocromatográfico rápido³⁸ a partir de muestras de exudado hepático o líquido ascítico para el diagnóstico *in situ* de la enfermedad (Fig. 10).

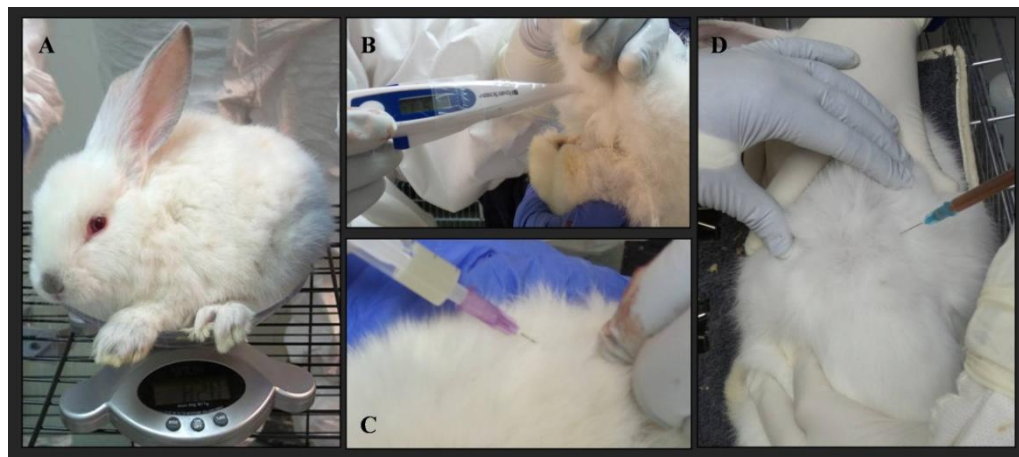


Figura 9. Procedimientos clínicos realizados durante el período experimental. (A) Medición del peso. (B) Medición de la temperatura. (C) Vacunación. (D) Infección.

4. Resultados

Tras la vacunación, los animales experimentaron ligeros incrementos de temperatura que oscilaban entre 0,4°C como media, a las 24 horas post-vacunación y 0,6°C a las 48 horas post-vacunación. Posteriormente, los valores de temperatura observados fueron fisiológicos. El peso de los animales aumentó durante los 7 días post-vacunación de forma similar al período control, sin observarse alteraciones en el engorde que se puedan atribuir a la vacunación.

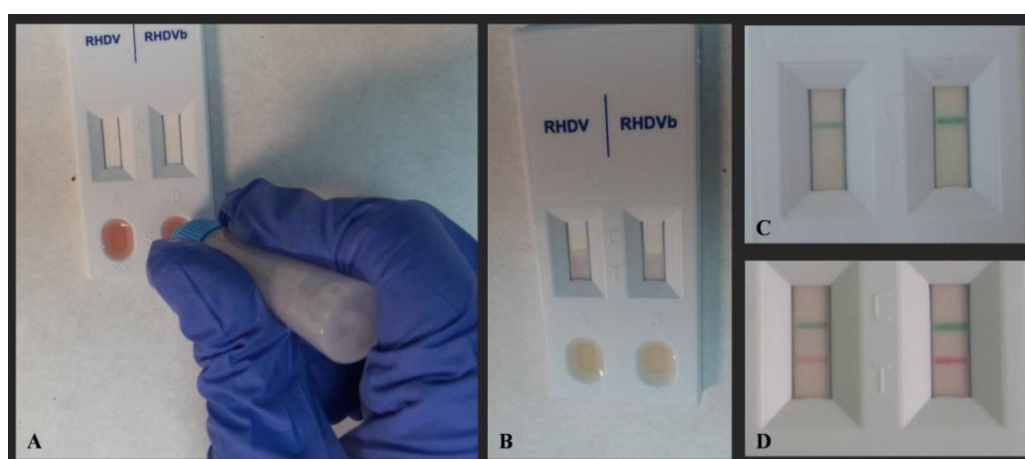


Figura 10. Realización del test diagnóstico inmunocromatográfico. (A) Aplicación del macerado de hígado en los pocillos A (RHDV) y B (RHDVb). (B) Tiempo de espera. (C) Aparición de la línea control (verde) en las ventanas de resultados A y B. (D) Aparición de las líneas de resultado (rojo) en las ventanas A y B.

³⁸ RHDV+RHDVb detection kit, CerTest BIOTEC (España)

Tabla VII. Ganancia Media Diaria (GMD) de los diferentes grupos

GRUPO	GMD
<i>Control 1</i>	24,9
<i>Control 2</i>	32,5
<i>Control 3</i>	28,7
<i>Control 4</i>	30,4
<i>Desafío 1</i>	29,8
<i>Desafío 2</i>	27,8
<i>Desafío 3</i>	28,9
<i>Desafío 4</i>	30,8
<i>Vacunal</i>	29,32

El estado sanitario de los animales era bueno, y su comportamiento durante este período fue normal. Los animales mostraron apetito e incrementaron su peso durante esta etapa del estudio. Todos los animales vacunados presentaban un nódulo subcutáneo de, aproximadamente, 1 cm de diámetro en el punto vacunal, que apareció a las 24-48 horas de la vacunación. La piel de la zona, que había sido rasurada previamente a la vacunación, aparecía enrojecida, y se observaba la protrusión del nódulo bajo la piel a simple vista (Fig. 11).

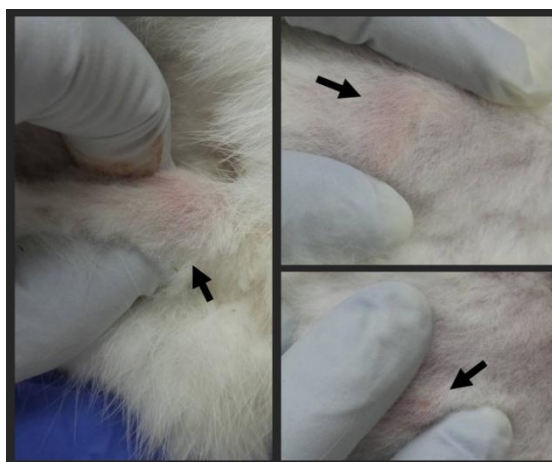


Figura 11. Nódulos vacunales de diferentes tamaños observados en los animales (flecha)

Tras la infección, se produjeron 10 bajas durante las primeras 96 horas, correspondientes a todos los animales de los grupos *control*, un animal del grupo *desafío 1* y un animal del grupo *desafío 4*. Estos animales mostraron síntomas de infección por el virus, como fiebre elevada, apatía, letargia, postración anorexia y signos neurológicos. Dos de estos

10 animales fueron eutanasiados por razones humanitarias, mediante sobredosis de barbitúricos, previa anestesia. Los animales que murieron debido a la infección mostraron, además, diferentes grados de epistaxis, que variaban entre secreción espumosa sero-sanguinolenta y hemorragia nasal profusa. Asimismo, se observó con gran frecuencia la posición de opistótonos entre los animales afectados. En el resto de los animales del estudio no se observaron síntomas indicativos de la enfermedad y sobrevivieron a la infección. Esporádicamente, se observaron síntomas de tipo inespecífico, como incremento de la temperatura, apatía o congestión conjuntival, que no interfirieron con la actividad normal de estos animales.

La eficacia vacunal se puede evaluar mediante el cálculo de la Fracción Prevenible (FP), que correlaciona el número de animales control y vacunados que han muerto debido a la infección, de la siguiente manera:

$$FP = \% ACM^{39} - \% AVM^{40} / \% ACM$$

Se considera que una vacuna es aplicable cuando el valor de FP es igual o superior a 0,8 (Tizard, 2009). Los valores obtenidos en nuestro estudio para cada uno de los aislados, se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Resultados del estudio vacunal. Número y porcentaje de ACM (Animales Control Muertos), AVM (Animales Vacunados Muertos) y FP (Fracción Prevenible)

AISLADO	ACM	%ACM	AVM	%AVM	FP
1	2/2	100	1/7	14	0,86
2	2/2	100	0/7	0	1
3	2/2	100	0/7	0	1
4	2/2	100	1/7	14	0,86

La necropsia de los animales pertenecientes al grupo *vacunal* no mostró lesiones atribuibles a la infección por el virus, como se esperaba. Los animales pertenecientes a los grupos *desafío* 1-4 mostraron, de forma esporádica, signos de carácter leve sugestivos de la infección, como hepatomegalia o congestión vascular generalizada. La necropsia de los animales pertenecientes a los grupos *control* 1-4 mostró lesiones severas, atribuibles a la infección por el RHDVb, como hepatomegalia, patrón lobulillar marcado, esplenomegalia,

³⁹ Animales Control Muertos

⁴⁰ Animales Vacunados Muertos

ascitis, congestión visceral y petequias, de forma consistente. El 100% de los animales pertenecientes a los grupos *control* mostró un resultado positivo en el test inmunocromatográfico (Fig. 12). En el caso de los grupos desafío, el 100% de los animales infectados con el inóculo 1 mostró un resultado positivo; los infectados con los inóculos 2, 3 y 4 mostraron un 50, 25 y 75% de resultados positivos, respectivamente. En el caso del grupo vacunal, los resultados obtenidos fueron negativos.

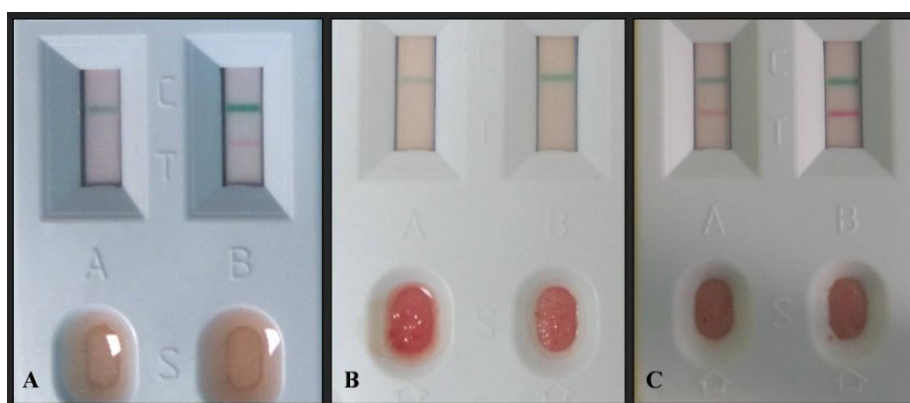


Figura 12. Resultados del test inmunocromatográfico realizado *in situ* a partir de tejido hepático (A) Resultado positivo a RHDVb, perteneciente a un animal infectado por el virus. (B) Resultado negativo, perteneciente a un animal del grupo vacunal. (C) Resultado positivo a RHDV (columna A) y RHDVb (columna B)

5. Discusión

Los resultados observados tras la vacunación muestran ligeros incrementos de temperatura, inferiores a 1°C sobre la temperatura fisiológica media de los animales. Un incremento de este tipo no provoca alteraciones en el comportamiento de los animales, su estado de consciencia o su bienestar, por lo que se considera un efecto adverso poco significativo derivado de la vacunación, que puede ser asumible. El segundo efecto adverso observado fue la formación de un nódulo subcutáneo, de aspecto caseoso y friable, adherido a la piel. Este efecto está descrito como resultado de la aplicación de vacunas adyuvantadas con hidróxido de aluminio (Munks, 2010) y se ha determinado que desaparece de los tejidos en el plazo aproximado de un mes, sin causar lesiones a los animales. Puesto que esta formación subcutánea no produce daño a los animales, y se elimina del organismo antes de su llegada a matadero, se considera que este efecto adverso es poco relevante. El incremento de peso de los animales durante el período post-vacunación fue similar al observado durante el período de cuarentena y en ningún caso disminuyó tras la vacunación, indicando que la vacunación no produjo efectos observables sobre la ingesta. No se observó relación entre el peso de los

animales en el momento de la vacunación y una mayor incidencia de signos post-vacunales, ni tampoco entre el peso en el momento de la infección y una mayor tasa de enfermedad.

Además de la notificación de posibles efectos adversos, la evaluación de una vacuna implica la valoración de su capacidad para prevenir la enfermedad. Se considera que una vacuna es efectiva y recomendable para su uso cuando el valor obtenido de FP es igual o superior a 0,8 (Tizard, 2009). En este estudio, los valores de FP obtenidos para los aislados 1 y 4 son de 0,86, lo que indica que la vacuna es apropiada para la prevención de la infección por dichas cepas. En el caso de los aislados 2 y 3, el valor obtenido es de 1, indicando la máxima efectividad frente a estos aislados. Estos resultados muestran cómo la vacuna es capaz de proteger a los animales frente a diferentes cepas del RHDVb que, presumiblemente, muestran diferencias como se deduce de los resultados observados entre los aislados 1,4 y 2,3. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los aislados 1 y 4 podrían mostrar un mayor grado de virulencia que los aislados 2 y 3, aunque sería necesario realizar un estudio comparativo con mayor número de animales para confirmar esta hipótesis. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el test inmunocromatográfico, que muestran un mayor porcentaje de animales positivos para los aislados 1 y 4 que para los aislados 1 y 2, lo que sugiere una mayor capacidad infectiva. No obstante, estos resultados deberían completarse con un análisis cuantitativo del virus en los tejidos, para determinar si, efectivamente, dichos aislados muestran una mayor capacidad de replicación y diseminación en el individuo.

Los resultados de la necropsia muestran la ausencia de signos atribuibles a la acción del virus en el grupo *vacunal*, como se esperaba; esta observación sugiere que la vacunación con el producto testado es capaz de prevenir la infección por el virus mediante la vía natural. En el caso de los animales pertenecientes al grupo *desafío*, infectados de manera experimental, se observa la presencia esporádica de lesiones leves que podrían ser resultado de la infección. Estas lesiones se explican por la actividad del virus en el organismo tras la infección que, si bien, no produce enfermedad en estos individuos, previamente vacunados, es capaz de inducir lesiones en los tejidos así como síntomas inespecíficos de enfermedad. Los resultados obtenidos en este grupo sugieren que la vacunación es capaz de prevenir el desarrollo de la enfermedad en animales infectados experimentalmente. Los hallazgos de necropsia en el grupo *control*, así como en los animales de los grupos *desafío* 1 y 4 que murieron debido a la infección, muestran lesiones indicativas de la infección por el RHDVb. Estos animales presentaron lesiones de mayor severidad a nivel hepático, esplénico, pulmonar, renal y vascular, fundamentalmente, y en algunos casos se observó ascitis, hemotórax y congestión en

nódulos linfoides y sistema nervioso central. Este tipo de lesiones, junto con los signos clínicos observados (fiebre, anorexia, alteraciones nerviosas) justifican la mortalidad producida por el virus en estos animales.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que la vacuna testada presenta una eficacia apropiada en la prevención de la infección producida por 4 aislados diferentes del RHDVb, lo que sugiere que podría ser también eficaz en la protección frente a otras cepas del virus. Su utilización en animales de 28 días ha demostrado la eficacia de su aplicación a edades tempranas, así como la idoneidad de la dosis y vía de administración propuestas. La efectividad de la vacuna y la ausencia de efectos adversos remarcables, indican que esta vacuna es apropiada para su uso generalizado en animales de menos de 30 días. Futuros estudios sobre la respuesta inmune inducida por la vacuna, su duración, los efectos de la re-vacunación o la transmisión vertical de la protección, serían de utilidad para complementar los resultados de este estudio.

Capítulo 2. Análisis de la respuesta immune en gazapos frente a un aislado español de RHDVb

1.a Resumen

La enfermedad hemorrágica del conejo está producida por un calicivirus denominado RHDV. Este agente patógeno, específico de especie, presenta una variante clásica (RHDV), que provoca enfermedad aguda con elevadas tasas de mortalidad en conejos adultos, y una nueva variante (RHDVb), que afecta fundamentalmente a gazapos causando una enfermedad de curso similar. Los efectos del virus en el organismo provocan graves lesiones a nivel hepático, donde se produce hepatitis necrotizante derivada de la replicación viral, y a nivel esplénico, donde la acción del virus provoca congestión severa y depleción linfóide. La congestión renal y pulmonar que se producen como consecuencia de la infección, son signos frecuentes en animales infectados por el virus. Se ha observado que los animales jóvenes, que son naturalmente resistentes al RHDV, pueden mostrar lesiones indicativas de la infección por el virus sin desarrollar por ello la enfermedad. El estudio del tipo de respuesta inmunológica que producen tras la infección ha revelado diferencias respecto a la que se elabora en los animales adultos. Esto sugiere, que los mecanismos de respuesta a la infección deben estar profundamente implicados en la infección por el RHDV y, por tanto, deberían estarlo también en la infección por el RHDVb. En este estudio se evaluó la respuesta inmune inducida por un aislado español de RHDVb en gazapos infectados experimentalmente. Para ello se llevó a cabo una prueba de IHA, con el objetivo de evaluar la producción de anticuerpos específicos por los animales en diferentes momentos a lo largo del período experimental. De forma complementaria, se realizó un ensayo ELISA-IFN γ , para determinar la producción de esta citoquina inmunomoduladora durante el período de estudio. Los resultados obtenidos en ambos ensayos se analizaron de forma paralela con el objetivo de determinar la influencia del IFN γ y el nivel de anticuerpos protectores sobre las tasas de mortalidad de la enfermedad. En este estudio se observa que los conejos con títulos protectores de anticuerpos frente al RHDVb, cuyos niveles de IFN γ aumentan de forma abrupta, mueren mostrando un cuadro agudo. Nuestros resultados sugieren que, independientemente del nivel de anticuerpos protectores, un incremento abrupto en los niveles de citoquinas durante la infección podría estar relacionado con un desenlace fatal de la enfermedad.

1.b Abstract

Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) is caused by a pathogenic calicivirus named Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV). This pathogen is species-specific and two variants have been described. The classic variant causes an acute disease and high mortality rates in adult rabbits, while the new variant (RHDVb) was found to cause a similar disease in young rabbits. The virus produces severe lesions in the liver, such as necrotizing hepatitis, due to viral replication in this organ. The effect of the virus on the spleen causes severe congestion and lymphoid depletion. Other frequent signs found among infected rabbits are visceral congestion and lung oedema. Ascites, haemorrhages and sudden death are all common signs of the disease. Young rabbits are naturally resistant to RHDV though they may show lesions suggestive of infection without developing the disease. Studies on the immune response produced by these resistant animals have revealed several differences in respect to the response produced by adults. This suggests that immune response mechanisms must be deeply involved in RHD and, consequently, they might also be important in RHDVb infection. In this study, we analyzed the immune response induced by an isolate of RHDVb recovered in Spain from young rabbits. We performed an HI assay, in order to evaluate the levels of specific antibodies over time and ELISA for the detection of IFN γ . Our aim was to assess the influence of IFN γ and antibody production on the fatality rates of the disease. In this study, we show that rabbits with protective antibody levels die when IFN γ suddenly increases and show acute signs of RHD. Our results suggest that, independently of antibody levels, an abrupt increase in serum cytokines during infection may be related to the lethal outcome of the disease.

2. Introducción

El RHDV⁴¹ es el agente etiológico de una enfermedad aguda de los conejos, que cursa con lesiones hepáticas, fiebre, hemorragias, signos neurológicos y elevadas tasas de mortalidad (Henning, 2005; OIE, 2016). La variante clásica del virus (RHDV) se describió por primera vez en China en 1984 (Liu, 1984) y provoca la enfermedad en conejos adultos expuestos al patógeno mediante todas las vías naturales (oral, nasal, conjuntival, fecal-oral, contacto directo), así como mediante fómites o vectores, como moscas o mosquitos (Abrantes, 2012). Las tasas de morbilidad y mortalidad del virus se aproximan al 100%, lo que ha producido enormes pérdidas económicas y ecológicas.

⁴¹ De sus siglas en inglés: *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus, Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo*

En 2010 se describió un nuevo virus relacionado con el RHDV. Este virus, denominado RHDVb/RHDV2 (OIE, 2015) mostraba diferencias significativas con el RHDV, a pesar de dirigirse a los mismos órganos diana y producir síntomas similares (Le Gall-Reculé, 2013). La diferencia más importante entre ambos virus es su hospedador, puesto que el RHDVb afecta a los gazapos, al contrario que el RHDV (Le Gall-Reculé, 2011; Dalton, 2012). Estos animales muestran además lesiones intestinales, mientras que el RHDV no muestra tropismo por este tejido. La segunda característica de importancia es la ausencia de protección cruzada entre ambos virus, lo que sugirió la existencia de diferencias de tipo genético y antigénico entre las dos variantes, que fueron más tarde demostradas (Le Gall-Reculé, 2013; Abrantes, 2013; Leuthold, 2015).

A pesar de no existir un tratamiento frente a la enfermedad, los brotes se han controlado mediante vacunación sistemática de los animales. Las vacunas actuales están producidas a partir del tejido hepático de animales infectados experimentalmente con el virus y son inactivadas, por lo que su seguridad está contrastada (Rodák, 1990; Argüello, 1991). Este tipo de vacunas resultan eficaces en la prevención de la enfermedad, sin embargo, su producción es costosa y presenta cierta controversia desde el punto de vista ético y de la bioseguridad, por lo que se han realizado multitud de investigaciones con el objetivo de desarrollar un tipo alternativo de vacunas. Durante las últimas décadas se han elaborado múltiples vacunas que han resultado efectivas desde el punto de vista experimental (Boga, 1994; Nagesha, 1995; Viaplana, 1997; Boga, 1997; Castañón, 1999; Martín-Alonso, 2003; Farnós, 2006; Pérez-Filgueira, 2007; Yuan, 2013; Li, 2014), sin embargo, ninguna de ellas se ha optimizado para su uso generalizado, por lo que las vacunas tradicionales continúan siendo el fármaco de elección. Asimismo, existen vacunas bivalentes de uso comercial (Bertagnoli, 1996; Peshev, 2015).

La enfermedad hemorrágica del conejo ha sido ampliamente investigada durante los últimos 30 años. Sin embargo, algunas de sus características patogénicas continúan siendo una incógnita (Trzeciak, 2015). Aspectos como la resistencia innata al virus en algunos animales o los mecanismos concretos que determinan la supervivencia de ciertos individuos, son elementos clave aún por definir. Se ha demostrado que los animales adultos responden al RHDV de manera diferente a los gazapos, que son naturalmente resistentes. En los primeros, se ha observado un incremento en las citoquinas tras la infección, que no ha sido observado en los animales más jóvenes, lo que resulta interesante (Teixeira, 2012; Marques, 2012). La observación de este tipo de reacción frente al virus en animales susceptibles y resistentes,

sugiere que podría existir un comportamiento similar frente al RHDVb. Para detectar la presencia de virus en los tejidos, se pueden realizar diferentes análisis laboratoriales, como ELISA-DAS, RT-PCR o qRT-PCR (OIE, 2016). La respuesta inmune inducida por el virus puede, asimismo, evaluarse mediante diferentes métodos. El método tradicional ha sido la IHA, ya que es un método estandarizado, sencillo y de bajo coste. En la actualidad, las técnicas ELISA a partir de muestras de suero son la técnica de elección, debido a su sencillez de uso y elevada sensibilidad (OIE, 2016; Gregg, 1992; Murphy, 1999).

El objetivo de nuestro estudio era la evaluación de la respuesta inmune desarrollada por gazapos expuestos a un aislado español de RHDVb, durante la fase inicial de la infección. Para ello, se llevaron a cabo análisis ELISA- IFN γ e IHA a partir de suero de animales vacunados y no vacunados, con el objetivo de determinar sus niveles de IFN γ y anticuerpos frente al virus.

3. Material y métodos

3.1 Preparación de los aislados virales

El aislado viral se obtuvo a partir de un brote de enfermedad similar a la RHD en gazapos, y fue caracterizado como RHDVb. Los inóculos virales se prepararon a partir de tejido hepático suspendido en PBS al 10%, centrifugado a 500g durante 20 minutos y, posteriormente, a 6000g durante 30 minutos (OIE, 2016). El sobrenadante se tituló mediante HA (OIE, 2016) utilizando eritrocitos humanos del grupo B (Dalton, 2012) y las alícuotas resultantes se almacenaron a -80°C (Fig. 14).

3.2 Experimentación animal

Todos los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la legislación vigente en materia de experimentación animal y fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, el Comité de Ética del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y la División de Protección Animal de la Comunidad de Madrid.

Para este estudio se seleccionaron 30 conejas no vacunadas de 28 días de edad, procedentes de un centro de multiplicación cuyos protocolos sanitarios son conocidos. Tras su llegada, los animales se mantuvieron en cuarentena durante 5 días, en los que no se detectaron problemas sanitarios ni de otro tipo. La experimentación se llevó a cabo en instalaciones NCB3, por lo que todas las condiciones ambientales fueron estables durante el período

experimental. La alimentación de los animales consistió en pienso comercial y heno *ad libitum*, y el agua de bebida también estaba a libre disposición. Las instalaciones eran revisadas dos veces al día, en los que se comprobaba el estado sanitario e higiénico de los animales, así como la presencia de alimento y agua. La monitorización del peso, temperatura y estado sanitario de los animales, y la toma de muestras de sangre se llevó a cabo a días alternos, reduciendo en lo posible el manejo de los animales (Fig. 13). Todos los procedimientos fueron realizados por personal especializado y prestando especial atención al bienestar animal.

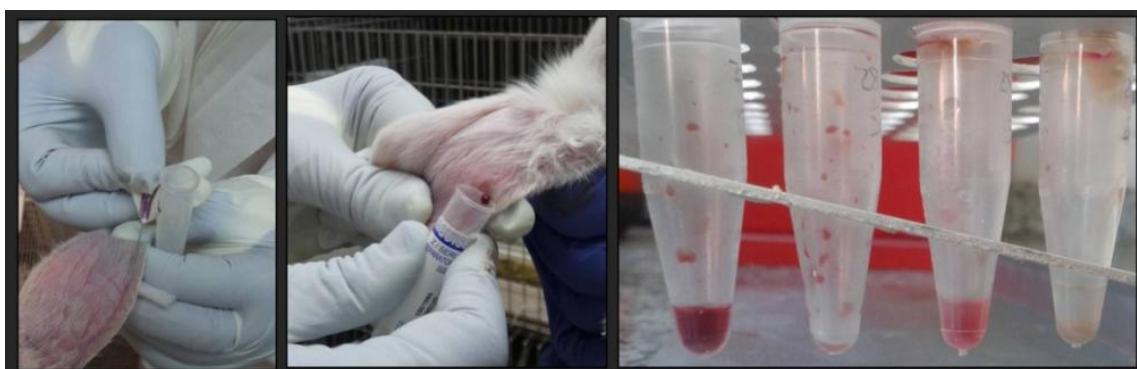


Figura 13. Procedimiento de toma de muestras de sangre

Los animales se distribuyeron en 5 jaulas acondicionadas, en grupos de 6 animales. Se establecieron 3 grupos: un grupo *desafío*, formado por 16 animales que se infectarían, previa vacunación, un grupo *control*, formado por 8 animales que se infectarían y un grupo *vacunal*, formado por 6 animales que serían vacunados. El día 1, los animales pertenecientes a los grupos *desafío* y *vacunal* fueron vacunados, según las recomendaciones del fabricante (1mL, vía subcutánea), mientras que a los animales del grupo *control* se les inyectó el mismo volumen de solución salina fisiológica, por la misma vía. El día 7, los animales de los grupos *desafío* y *control* fueron infectados con 1 mL de inóculo viral, vía intramuscular, mientras que los animales del grupo *vacunal* fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina fisiológica.

Los animales que mostraron signos de enfermedad tras la infección, fueron eutanasiados, previa sedación, mediante sobredosis de barbitúricos. El resto de los animales fueron monitorizados durante 10 días adicionales y eutanasiados, siguiendo el mismo procedimiento, al final del período experimental. Se realizó la necropsia de todos los animales con objetivos diagnósticos y de toma de muestras. Las muestras de hígado se almacenaron en suspensión de PBS al 10% a -80°C.

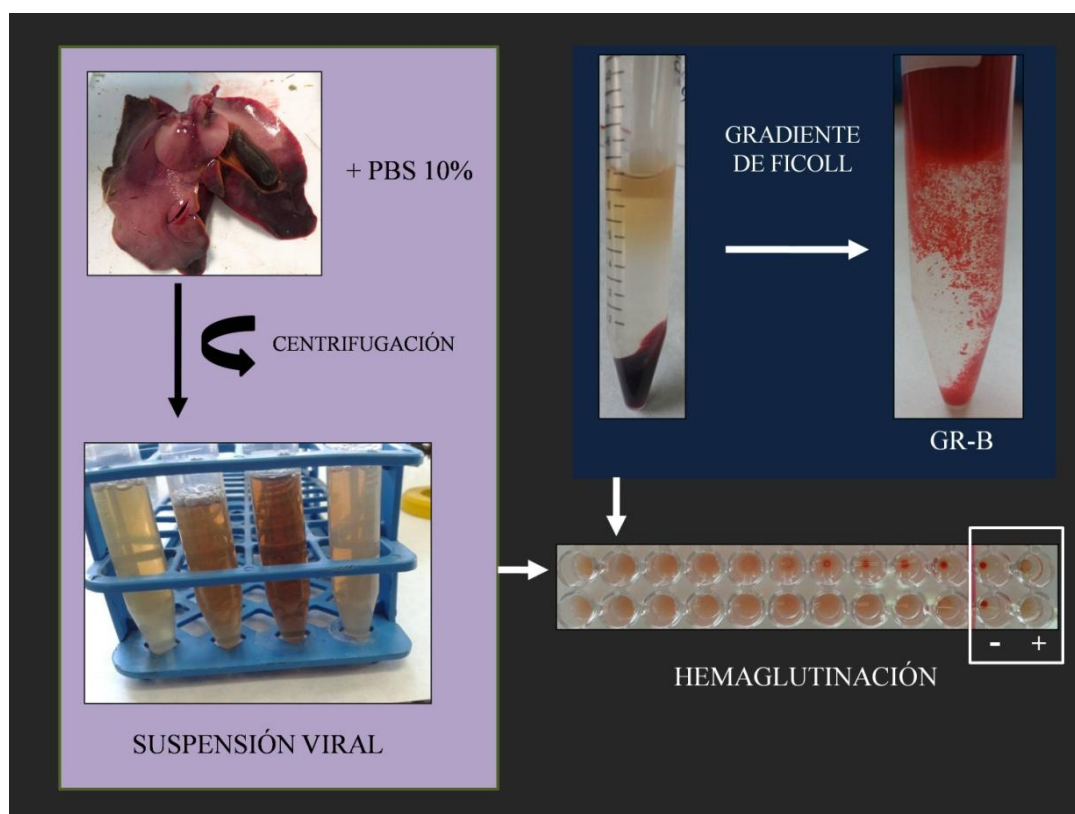


Figura 14. Procedimiento de preparación de los inóculos virales para la infección

3.3 ELISA-DAS

Se utilizó un ELISA comercial⁴² con el objetivo de determinar la efectividad de la infección experimental mediante la detección del antígeno viral en tejido hepático (Fig. 15). El sistema utiliza anticuerpos policlonales y monoclonales frente a la proteína VP60 de la cápside para determinar la presencia del virus en la muestra. Se analizaron muestras de todos los animales pertenecientes a los grupos desafío y control, así como muestras de los animales incluidos en el grupo vacunal, como control negativo. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro⁴³, a DO_{450} ⁴⁴ y el punto de corte se calculó según las indicaciones del fabricante, como el 15% del valor de absorbancia del control positivo.

3.4 Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

Este método estandarizado (OIE, 2016) se utilizó para determinar el título de anticuerpos específicos presentes en el suero (Fig. 16). La prueba consiste en la exposición

⁴² R.17.RHD.K2, Ingenasa, Spain

⁴³ Athos reader 2001, Athos Labtec Instruments

⁴⁴ Densidad óptica: 450 nm

del antígeno a una dilución seriada del suero en PBS 1:2. Tras una primera incubación del suero con el antígeno, durante 30 minutos a 25°C, se añadieron eritrocitos humanos del grupo B (Dalton, 2012) para una segunda incubación, durante 30 minutos a 25°C. En cada placa se incluyeron controles positivo y negativo. Se considera que títulos inferiores a 1/20 son negativos, mientras que los superiores a 1/20 son positivos (OIE, 2016). Se analizaron 6 muestras recogidas a lo largo del período experimental. La primera muestra se obtuvo el día 0 (previa a la vacunación) y su valor representa el nivel basal de anticuerpos frente al virus. Las siguientes muestras se tomaron a 48 h, 96 h y 7 días post-vacunación y, tras la infección, a las 96 y 148 horas.

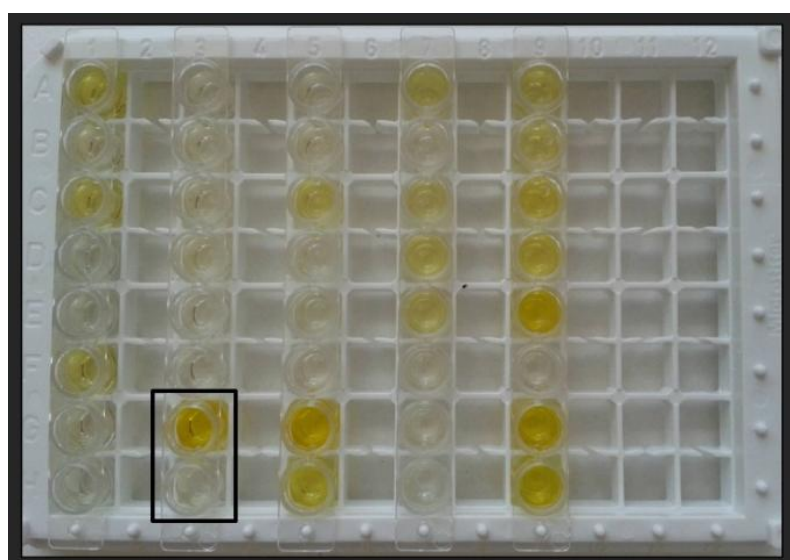


Figura 15. Imagen de la placa ELISA-DAS. Se señalan los controles positivo (sup) y negativo (inf)

3.5 ELISA-IFN γ

Se analizaron muestras de suero de animales pertenecientes a todos los grupos con el objetivo de determinar la producción de IFN γ mediante un ELISA comercial⁴⁵. Las muestras incluidas en este estudio se tomaron el día 0 (nivel basal), 3 (2 días post-vacunación), 5 (4 días post-vacunación) y 9 (2 días post-infección). Los valores de absorbancia obtenidos a DO₄₅₀⁴⁶ fueron transformados en valores de concentración, siguiendo las instrucciones del fabricante y los valores medios de cada grupo se utilizaron para construir una curva representativa de la evolución en los niveles de IFN γ durante el período experimental.

⁴⁵ RayBio® Rabbit IFN γ ELISA kit, RayBiotech, USA

⁴⁶ Densidad óptica: 450 nm

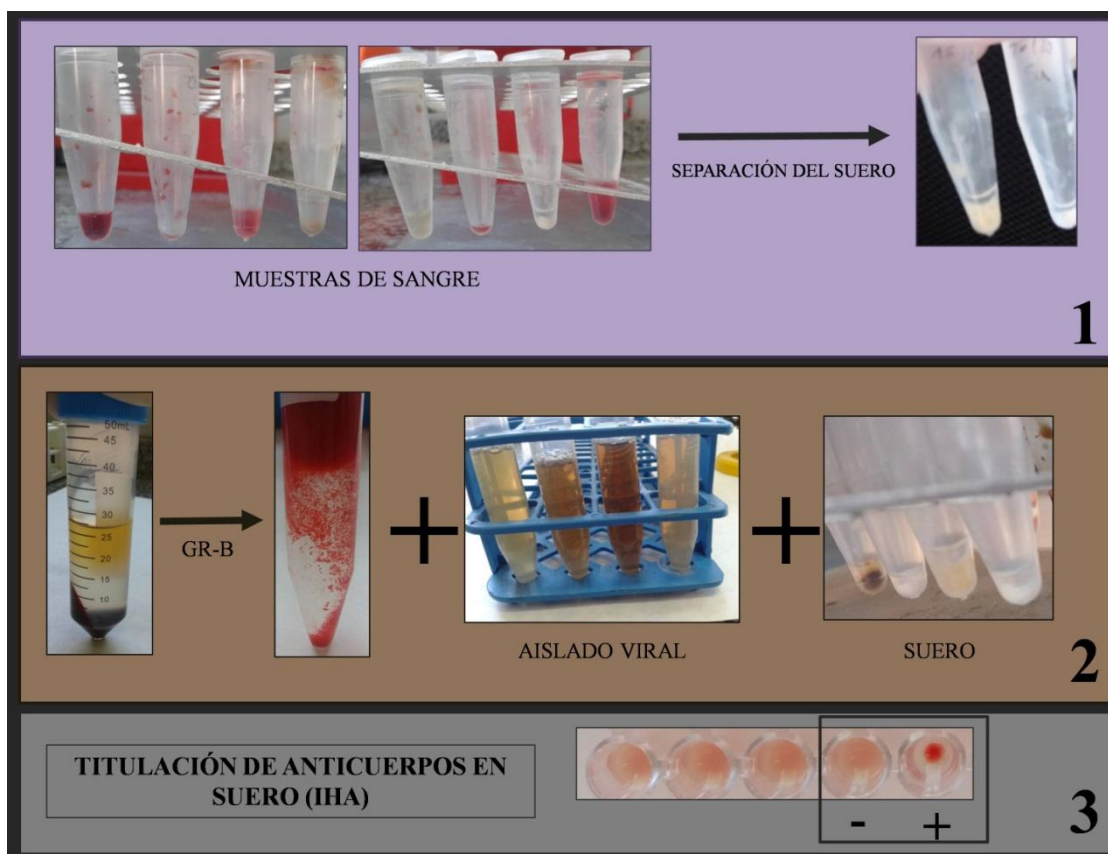


Figura 16. Esquema del procedimiento de IHA. 1. Separación del suero de las muestras de sangre. 2. Incubación de suero con antígeno y GR-B. 3. Resultados de la titulación. Se señalan los controles negativo y positivo.

4. Resultados

4.1 Infección experimental

Todos los animales pertenecientes al grupo *control* mostraron síntomas de la enfermedad y murieron o fueron eutanasiados por cuestiones humanitarias, durante las 48-96 horas post-infección. Algunos de los animales pertenecientes al grupo *desafío* mostraron signos inespecíficos de enfermedad como apatía, congestión conjuntival o incrementos esporádicos en la temperatura, que alcanzaron los 38,5-41°C. Los animales incluidos en el grupo *vacunal* no mostraron síntomas de enfermedad y fueron eutanasiados, al igual que los animales pertenecientes al grupo *desafío*, al final del período experimental.

Los animales pertenecientes al grupo *vacunal* no mostraron signos de necropsia indicativos de enfermedad, como se esperaba. Los animales incluidos en el grupo *desafío* mostraron lesiones leves sugestivas de infección por el virus, tales como palidez hepática, hepatomegalia, congestión visceral y petequias, mientras que los animales pertenecientes al grupo *control* mostraron lesiones severas atribuibles a la infección por el RHDVb, como

hepatomegalia, patrón lobulillar marcado, esplenomegalia, congestión visceral marcada, ascitis y edema pulmonar.

Todos los animales de los grupos *desafío* y *control* obtuvieron resultados positivos en el ELISA-DAS, lo que indica presencia de infección viral. La DO₄₅₀ media para el grupo *desafío* fue 0,37 mientras que para el grupo *control* fue 0,46. Los animales del grupo *vacunal* obtuvieron resultados negativos, como se esperaba, con valores inferiores a 0,3.

4.2 Niveles de IFN γ

Los resultados medios obtenidos en el análisis ELISA para cada grupo se muestran en la Tabla N. El grupo *vacunal* experimentó un incremento en los niveles de IFN γ tras la vacunación, de 0,93 a 1,93 ng/ μ L a las 96 horas post-vacunación (Fig. 17; Tabla IX). En adelante, estos niveles disminuyeron de forma sostenida hasta el final del período experimental, en que volvieron a alcanzar los niveles basales. El grupo *desafío* mostró un ligero incremento en los niveles de IFN γ de 0,93 a 1,02 ng/ μ L durante los 7 días posteriores a la vacunación. Posteriormente, estos niveles se incrementaron hasta 2,9 ng/ μ L al final del período experimental, 172 horas más tarde. El grupo *control* mostró niveles estables de IFN γ , alrededor de 1 ng/ μ L hasta el día de la infección. Posteriormente, estos niveles se incrementaron de forma brusca de 1,35 a 6,7 ng/ μ L en las siguientes 96 horas. Tras este momento no fue posible obtener más muestras debido a las bajas ocurridas en este grupo.

Tabla IX. Valores medios de IFN γ (ng/ μ L) en los 3 grupos durante el período experimental. Vac: vacunación, hpv: horas post-vacunación, dpv: días post-vacunación, Inf: infección, hpi: horas post-infección

	0 (Vac)	48 hpv	96 hpv	7 dpv / 0 (Inf)	96 hpi	172 hpi
Desafío		0,93	0,96	1,02	2,51	2,9
Control		1,02	1,12	1,35	6,7	
Vacunal	0,93	1,4	1,93	1,33	1,27	0,81

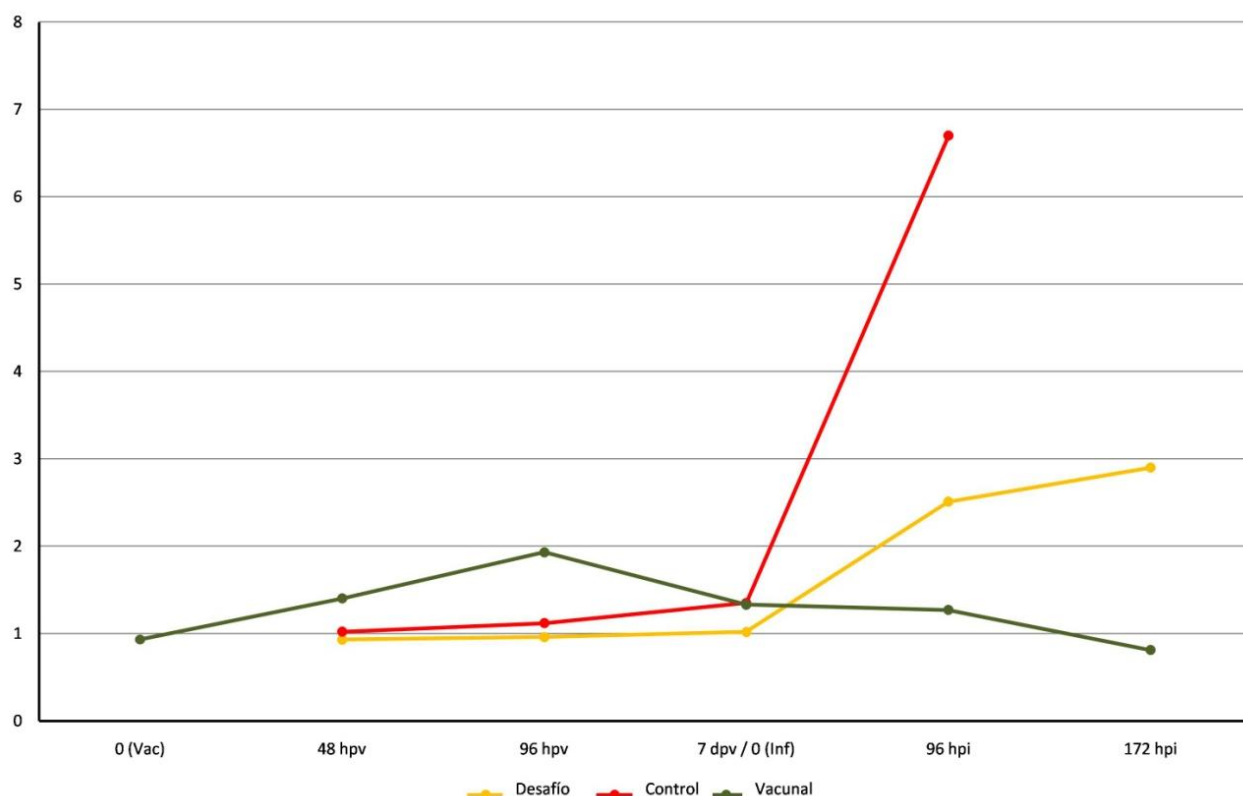


Figura 17. Representación de los niveles medios de IFN γ en los 3 grupos de animales a lo largo del período experimental

4.3 Niveles de anticuerpos específicos frente al RHDVb

Los resultados medios obtenidos en el ensayo de IHA para cada grupo se representan en la Fig.18. El título basal medio oscila entre 1/16 y 1/32, mientras que el título al final del período experimental sobrepasa 1/64 en los 3 grupos.

El grupo *vacunal* desarrolló un incremento progresivo en la producción de anticuerpos, alcanzando 1/128 once días tras la vacunación. Este valor se mantuvo estable hasta el final del período experimental. El grupo *desafío* mostró un incremento de 1/16 a 1/64 durante las 48 horas post-vacunación y disminuyó ligeramente sus niveles a partir de ese momento, hasta el día 7. Tras la infección, los niveles de anticuerpos alcanzaron 1/64 durante las primeras 96 horas y alcanzaron valores cercanos a 1/128 al final del período experimental. El grupo *control* mantuvo niveles estables de anticuerpos que oscilaban alrededor de 1/32 hasta el día 7 y alcanzó 1/128 durante las primeras 96 horas tras la infección.

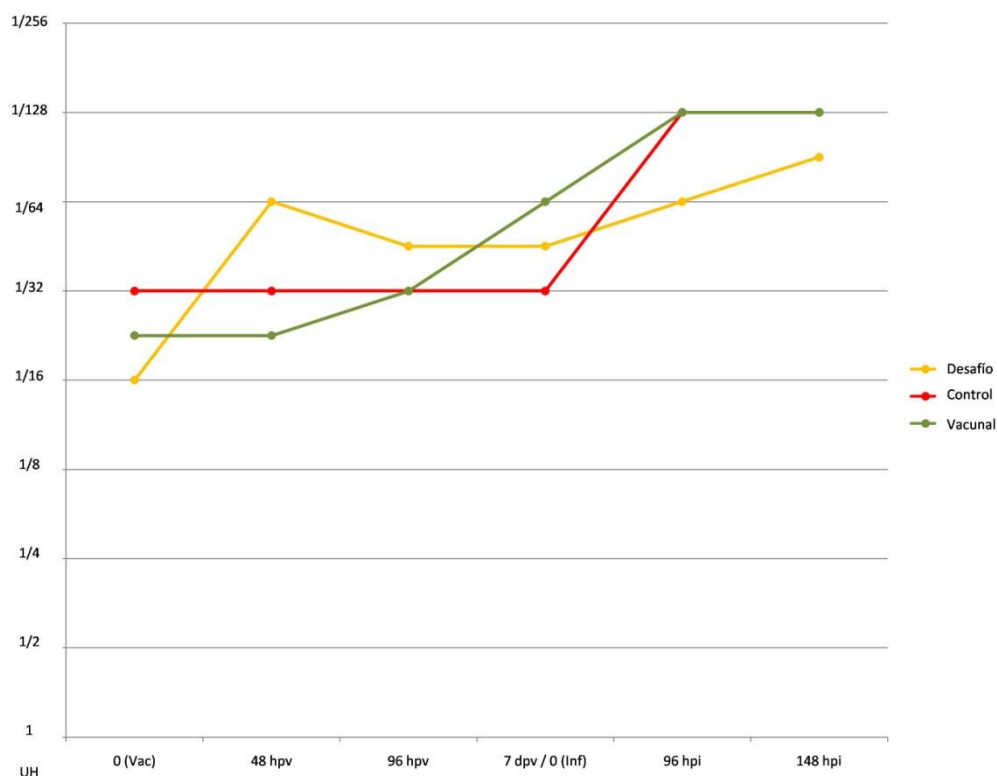


Figura 18. La gráfica representa el título medio de anticuerpos de los 3 grupos, en Unidades Hemaglutinantes (UH), durante el período experimental

5. Discusión

En este estudio se llevó a cabo una infección experimental con RHDVb en conejos recién destetados. La infección se demostró *in situ*, mediante la realización de la necropsia, así como de forma laboratorial, utilizando un método ELISA-DAS. Los animales pertenecientes al grupo *vacunal* mostraron signos inespecíficos de necropsia, mientras que los animales pertenecientes al grupo *desafío* mostraron signos sugestivos de infección por el virus. El grupo *control*, cuyos animales murieron antes del fin del período experimental, mostraron lesiones severas indicativas de infección por el RHDVb, como se esperaba. Estos datos muestran que la infección tuvo lugar de forma efectiva tanto en el grupo *desafío* como *control*. Mientras que en el primer grupo se obtuvieron valores de absorbancia cercanos al punto de corte, el segundo obtuvo niveles más alejados, probablemente debido a la mayor carga viral existente en los individuos del grupo *control*. Estos datos se relacionan con los signos clínicos observados en los animales de estos grupos, así como con los hallazgos de necropsia, ambos de carácter severo en el grupo *control*, probablemente debido a la mayor replicación viral que tuvo lugar, respecto al grupo *desafío*. Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune que se producía de forma temprana en los gazapos, se monitorizaron los

niveles de IFN γ y el título de anticuerpos, ya que ambos se encuentran implicados en la respuesta temprana a la infección viral y el desarrollo de la enfermedad (Tisoncik, 2012; Tizard, 2009). Todos los animales mostraron títulos basales de anticuerpos entre 1/16-1/32, lo que se explicaría por la presencia de inmunidad maternal residual. Los animales pertenecientes a los grupos *vacunal* y *desafío* mostraron un incremento paralelo en el título de anticuerpos hasta el día 7, confirmando las indicaciones del fabricante, que garantiza la inmunidad en 7 días. El título en el grupo *vacunal* se incrementó durante las siguientes 96 horas, alcanzando niveles que permanecieron estables hasta el final del período experimental. Los animales pertenecientes al grupo *desafío* incrementaron sus niveles de forma más lenta y alcanzaron los mismos valores 52 horas más tarde. Es probable que la infección de los animales del grupo *desafío* el día 7 interfiriese con su capacidad para alcanzar los niveles máximos esperados tras la vacunación. A pesar del retraso relativo respecto al grupo *vacunal*, en ambos casos se alcanzaron títulos de anticuerpos protectores frente al virus. Los animales pertenecientes al grupo *control* mostraron los títulos basales de anticuerpos más elevados del estudio y permanecieron estables hasta el momento de infección. Durante las 96 horas post-infección, estos animales alcanzaron el mismo título que mostraban los grupos *desafío* y *vacunal*. Resulta llamativo que los animales pertenecientes al grupo *control* no sobrevivieran a la infección a pesar de contar con títulos protectores de anticuerpos específicos. Existen múltiples factores que contribuyen al desarrollo de la respuesta inmune, como la interferencia con anticuerpos maternos, el estrés debido al manejo o la cría, así como factores individuales, entre otros (Tizard, 2009; Gómez-Lucía, 2007; Abrantes, 2012). No obstante, la incapacidad de evitar la enfermedad, en presencia de una respuesta inmune protectora, es un elemento a investigar. Con el objetivo de obtener una imagen más amplia de la respuesta inmune durante el desarrollo de la enfermedad, se monitorizaron los niveles de IFN γ en todos los grupos. Se observó que en los grupos *vacunal* y *desafío*, los niveles de IFN γ se incrementaron ligeramente tras la vacunación, como se esperaba debido a la presencia en la misma de antígenos virales. Tras el incremento inicial, el grupo *vacunal* experimentó un descenso en sus niveles de IFN γ en las siguientes 172 horas, probablemente relacionado con la ausencia de exposición al antígeno. El grupo *desafío* incrementó la concentración de IFN γ de 1,02 ng/ μ L el día 7, hasta 2,9 ng/ μ L durante las siguientes 172 horas. Este incremento se corresponde con la estimulación del sistema inmune frente a un antígeno previamente conocido. El grupo *control*, cuyos niveles basales de IFN γ oscilaban en torno a 1 ng/ μ L, incrementó sus niveles de 1,35 ng/ μ L el día 7 hasta 6,7 ng/ μ L durante las siguientes 96 horas. Resulta esperable que la exposición natural al virus en animales no vacunados produzca un

incremento en los niveles de IFN γ que pueda sobrepasar los obtenidos tras la vacunación. No obstante, el incremento de IFN γ en el grupo *control* fue mucho más rápido y agresivo que en el grupo *desafío*, lo que podría desencadenar graves consecuencias en los animales.

Las citoquinas, incluyendo el IFN γ , son potentes inmunomoduladores, esenciales para la inmunidad. No obstante, el efecto tóxico que pueden producir cuando se liberan de forma masiva se ha descrito ampliamente (Tizard, 2013; Schroder, 2004) y puede producir daño tisular, fiebre e incluso la muerte. Nuestros resultados sugieren que, a pesar de que los animales pertenecientes al grupo *control* mostraban signos clínicos indicativos de lesiones severas, el abrupto incremento en los niveles de IFN γ en un período tan corto de tiempo podría haber sido decisivo en el desenlace de la enfermedad. Se ha demostrado que incrementos bruscos de IFN γ son indicativos de mayores tasas de mortalidad en medicina humana y constituyen un signo predictivo de la severidad del proceso (Bozza, 2008; Sun, 2012; Teijaro, 2014; Liu, 2017). Por tanto, se podría inferir que los animales que sufren hipercitoquinemia son más susceptibles de desarrollar un síndrome tóxico que puede aumentar la severidad del proceso subyacente, provocando la muerte en múltiples casos. Esta observación concuerda con nuestros resultados y establece una alternativa al punto de vista tradicional sobre la patogenicidad del RHDV. La mayor parte de los estudios señalan la disfunción hepática como causa principal de muerte durante la enfermedad hemorrágica y, si bien es cierto que durante la enfermedad se puede desarrollar un fallo hepático fulminante (OIE, 2016; Abrantes, 2012), es probable que una respuesta inmune exacerbada frente al virus, en las fases iniciales de la infección, esté implicada en su letalidad, puesto que la liberación masiva de citoquinas puede resultar tan lesiva como la propia replicación viral (Aguas, 2014). A día de hoy se desconoce la causa por la que ciertos animales que muestran signos indicativos de infección, como ocurre en el grupo *desafío*, sobreviven sin desarrollar la enfermedad, mientras otros mueren en pocas horas mostrando síntomas severos. Asimismo, se desconoce por qué algunos animales parecen ser naturalmente resistentes a la infección. No obstante, las observaciones realizadas en infecciones por RHDV, al que los gazapos son resistentes, muestran resultados interesantes. En estos casos, se podían observar lesiones indicativas de RHDV en el hígado de los gazapos, pero no progresión de la enfermedad, a pesar de las lesiones (Ferreira, 2005). Por otro lado, se determinó la presencia de diferencias hematológicas entre animales jóvenes y adultos durante la infección, señalando que las características de la respuesta inmune están involucradas en el desarrollo de la enfermedad, como parece ocurrir en el RHDVb (Marques, 2010; Marques, 2014). Los resultados de

nuestro estudio sugieren que la capacidad de los animales para evitar la letalidad del virus no depende exclusivamente de una adecuada producción de anticuerpos específicos, sino de la apropiada modulación de la respuesta inmune. El efecto que producen las citoquinas en el desarrollo de la enfermedad hemorrágica se desconoce casi por completo. La importancia de la susceptibilidad individual, las señales moleculares que desencadenan su liberación o su efecto a nivel global en la patogenicidad de la enfermedad son algunos de los aspectos a investigar en futuros estudios (Tisoncik, 2012; Trzeciak, 2016).

6. Conclusiones

Nuestros hallazgos preliminares señalan la implicación de la producción masiva de citoquinas en el desarrollo de un cuadro letal durante la infección por el RHDVb. Sin embargo, es preciso realizar una investigación complementaria antes de poder confirmar que una tormenta de citoquinas podría ser responsable del shock letal que el RHDVb produce en los animales.

Capítulo 3. Análisis comparativo de los hallazgos anatomopatológicos en gazapos infectados con 4 aislados de RHDVb

1.a Resumen

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) es un calicivirus patógeno, que afecta a conejos adultos causando una enfermedad de curso generalmente agudo, con elevadas tasas de mortalidad. Este virus es específico de especie, y coloniza el organismo mediante todas las vías naturales (oral, nasal, conjuntival, parenteral), a través del contacto directo con animales infectados, por vía aerógena, por fómites y a partir de vectores. Tras su entrada en el organismo, el virus se replica en el hígado, donde produce hepatitis necrotizante, y se disemina por vialinfohemática causando lesiones a nivel esplénico y pulmonar, así como alteraciones vasculares. Como resultado, se produce una severa congestión visceral, hemorragias internas y externas y microtrombos vasculares. Los hallazgos más frecuentes de necropsia son hepatomegalia, esplenomegalia y congestión orgánica. El hígado se muestra, además, friable y muestra un marcado patrón lobulillar como resultado de la necrosis inducida por el virus. El bazo aparece aumentado de tamaño, mientras que en los riñones el hallazgo más frecuente es la presencia de petequias de diferente extensión. La congestión pulmonar se acompaña a menudo de edema y signos de neumonía intersticial. Debido al rápido curso clínico de la RHD, los animales suelen presentar una buena condición corporal y no se observan signos externos post-mortem, exceptuando la presencia de epistaxis en algunos casos. Recientemente, se ha descrito una nueva variante del RHDV que afecta a gazapos menores de 40 días, causando una enfermedad de curso clínico similar. El agente causal de la enfermedad se denomina RHDVb y sus órganos diana son el hígado y el bazo, al igual que en la variante clásica del virus. Sin embargo, se ha determinado que el RHDVb presenta cierta afinidad por el tejido intestinal, característica que comparte con los calicivirus no patógenos del conejo (RCV) y que no suele aparecer en las infecciones por RHDV. En este estudio se analizan los hallazgos anatomopatológicos observados en gazapos infectados experimentalmente con 4 aislados del RHDVb, en cuanto a extensión y severidad y se realiza un análisis comparativo de los mismos. Nuestros resultados sugieren diferencias en la patogenicidad de estos aislados, y muestran la correlación existente entre estos datos y los datos clínicos observados durante el estudio.

1.b Abstract

Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) is a pathogenic calicivirus which causes an acute disease in adult rabbits. This virus colonizes the organism by all natural routes (oral, nasal, conjunctival, parenteral), by direct contact, through fomites, and/or vectors. Upon infection, the virus replicates in the liver, causing necrotizing hepatitis and disseminating through blood vessels. It causes spleen and lung lesions, as well as severe visceral congestion, haemorrhages and vascular microthrombi. The most frequent necropsy findings are hepatomegaly, splenomegaly and general congestion. As a result of the viral replication, the liver appears friable and shows a marked lobe pattern. The spleen and the kidneys are congestive and the latter usually show petechiae. Lungs often show congestion, oedema and interstitial pneumonia signs. Due to the rapid course of RHD, the animals are usually found to have good corporal condition and lack of external signs of disease. However, epistaxis is found sporadically. A new variant of the virus has been recently described. It was named RHDVb and causes a similar disease in rabbits under 40 days of age. The target organs of the virus are also the liver and the spleen. However, it has been described that this new virus has affinity for the intestines, as other non-pathogenic rabbit calicivirus (RCV) do. In this study, we investigated the anatomopathological findings observed in rabbit kittens infected with 4 isolates of RHDVb in terms of extension and severity of the lesions. Our results suggest differences in the pathogenicity of the 4 isolates, and show the correlation between the anatomopathological findings and the clinical signs observed during the study.

2. Introducción

Durante la segunda mitad del siglo XX, las poblaciones de conejo fueron asoladas por dos importantes enfermedades. En los años 50, la mixomatosis apareció como resultado de un salto de especie, afectando al conejo europeo (*O. cuniculus*) con gran virulencia. Como resultado de esta epidemia, las poblaciones fueron diezmadas y aun hoy en día no han conseguido recuperarse. Años más tarde, en la década de los 80, una nueva enfermedad epidémica conocida inicialmente como “fiebre hemorrágica” afectó de nuevo al conejo europeo provocando grandes pérdidas y un importante impacto en las poblaciones, ya debilitadas. Esta enfermedad, denominada Enfermedad Hemorrágica del Conejo (RHD) emergió en China en 1984 (Liu, 1984) tras la importación de un lote de conejos de angora procedentes de Alemania. La infección producía una rápida enfermedad en los animales, causando millones de bajas durante los primeros meses y se extendió rápidamente a través de

Europa, Asia y América Central. En la actualidad, es endémica en más de 40 países (OIE, 2016).

El agente etiológico de la enfermedad es el Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (RHDV). Este agente patógeno no es cultivable *in vitro* e inicialmente fue clasificado como parvovirus (Xu, 1991; Zhao, 1992; Zheng, 1992) y también como picornavirus (Xu, 1989; Pu, 1985), hasta que estudios posteriores demostraron que se trataba de un calicivirus (Parra, 1990), perteneciente al Género *Lagovirus*. A pesar de las dificultades que implica el estudio de un virus no cultivable, las características y propiedades del RHDV han sido ampliamente investigadas. El virus coloniza a su hospedador mediante todas las vías naturales (oral, oronasal, conjuntival, fecal-oral), por contacto directo y a través de fómites como útiles de trabajo, pelo, alimento, agua y material de la cama (Merchan, 2011). Los cadáveres de animales infectados por el virus también resultan una importante herramienta de diseminación de la enfermedad. Se ha demostrado que el virus es capaz de sobrevivir y permanecer infectivo durante períodos de hasta 3 meses en muestras biológicas expuestas al medio ambiente (Henning, 2005). La transmisión a través de vectores, como moscas y mosquitos, puede ocurrir tanto a partir de estos residuos biológicos, como de animales vivos infectados (Lugton, 1999; McColl, 2002; Henning, 2005b,c).

Esta enfermedad afecta a conejos adultos (Collins, 1995), con tasas de morbilidad del 100% y tasas de mortalidad del 40-100% (Henning, 2005). El período de incubación oscila entre 12-36 horas y la viremia se produce de forma rápida (Gregg, 1991; Marcato, 1991). El principal órgano diana es el hígado, donde ocurre la replicación; en él se produce necrosis extensa, que conduce a un fallo hepático. El bazo y los pulmones también se encuentran afectados por el virus, observándose incremento de tamaño y congestión en el primero, y edema y lesiones petequiales en los segundos. Es frecuente la presencia de hemorragias y congestión en diversas localizaciones, tales como los riñones, corazón, timo y linfonódulos (Abrantes, 2012). Los animales suelen experimentar sintomatología de tipo nervioso, especialmente ataxia y convulsiones, previa a la muerte. La presencia de epistaxis es un hallazgo característico de esta enfermedad (Marcato, 1991). En la actualidad, la aparición de brotes de RHD se controla mediante vacunación sistemática de los animales.

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo es, como el resto de calicivirus, muy variable, debido a la elevada tasa de mutación que existe en los virus ARN (Capucci, 1998; Alda, 2010). Una de las primeras observaciones que llamaron la atención sobre la evolución

del RHDV fue la escasa variabilidad que presentaba (Le Gall-Reculé, 2013), y que se describió tanto en regiones relativamente aisladas como Australia (Asgari, 1999), como en regiones que se hallaban en el centro de emergencia de los brotes, como Francia (Le Gall-Reculé, 2003). En este país se había descrito, además, la ausencia de diferencias significativas entre los aislados de animales silvestres y domésticos (Le Gall-Reculé, 1998). Sin embargo, existía constancia de la sustitución secuencial de grupos genéticos característica de los virus ARN, como es el caso del genogrupo G1 en la Península Ibérica (Alda, 2010) o de la sustitución de la variante clásica por el nuevo virus RHDVb, cuya moderada virulencia constituye, probablemente, una ventaja selectiva frente al anterior (Le Gall-Reculé, 2013). Hasta el momento, se han descrito 3 variaciones en el virus: la primera forma descrita fue la denominada **variante clásica (RHDV)**, que cuenta con 6 genogrupos (G1-G6), de los cuales, el genogrupo G6 fue posteriormente definido como variante genética y antigénica del virus, y se denominó **RHDVa**. En 2010 se describió una nueva variante del virus (Le Gall-Reculé, 2011; Dalton, 2012) llamada **RHDVb/RHDV2** como término diferencial respecto al RHDV. Este nuevo virus resultó especialmente preocupante debido a su capacidad para infectar gazapos y a la ausencia de protección cruzada con las cepas conocidas hasta entonces. Al igual que ocurrió con el RHDV, el RHDVb se diseminó rápidamente a nivel global (Abrantes, 2013; Dalton, 2014; Baily, 2014; Camarda, 2014; Westcott, 2015; Hall, 2015).

Uno de los aspectos más relevantes en el estudio de este virus es su origen como agente patógeno. La emergencia del RHDVa y, posteriormente del RHDVb, cuestionó de nuevo el origen de los calicivirus patógenos, al determinarse que no procedían del RHDV, sino que su aparición había ocurrido de forma independiente (OIE, 2016; Capucci, 2017). En la actualidad, existen varias hipótesis acerca de la emergencia de calicivirus patógenos (Abrantes, 2012), siendo las más aceptadas la posible evolución del virus a partir de un calicivirus no patógeno del conejo (Forrester, 2006; Le Gall-Reculé, 2013), la recombinación entre varios calicivirus (Abrantes, 2008; McIntosh, 2007) o el salto de especie a partir de un reservorio (Abrantes, 2012). No obstante, la hipótesis que cobra más fuerza es la que apunta a la mutación de un virus no patógeno, puesto que se han observado animales seropositivos y portadores de ARN viral en regiones donde no se ha descrito la enfermedad (Nagesha, 2000) y se han detectado anticuerpos específicos en animales, previos a los primeros brotes. La investigación de las cepas apunta a la circulación de los virus de forma asintomática (Moss, 2002) y la aparición de virulencia debida a un cambio genético (Capucci, 1996; Moss, 2002; Alda, 2008).

Sin embargo, los estudios sobre el TMRCA⁴⁷ ofrecen datos confusos sobre la aparición de las primeras cepas, que se situarían entre mediados del siglo XVI y del XX (Kinnear, 2010; Alda, 2010). No obstante, estos datos no explicarían la ausencia de notificación de la enfermedad hasta 1984 (Abrantes, 2012), por lo que la incógnita sobre el origen temporal de los primeros virus relacionados con el RHDV permanece en suspenso. El estudio filogenético de los diferentes aislados virales proporciona datos de gran interés para la comprensión de las relaciones entre estos virus. Se ha determinado que el RHDV y el RHDVa, los RCV y el RHDVb forman tres grupos distintos y muy relacionados (Abrantes, 2013; Dalton, 2015). El estudio de las relaciones filogenéticas entre ellos y de las diferencias entre sus secuencias genéticas son esenciales para la elaboración de vacunas específicas y la comprensión de sus características de patogenicidad. Asimismo, los estudios sobre el posible origen del RHDV aportan una información que podría ser útil en la prevención de nuevos cambios en el virus y la previsión de los mismos.

La aparición de mutaciones durante la evolución de los calicivirus se relaciona con las elevadas tasas de error de sus polimerasas durante la replicación (Alda, 2010) y con la existencia de una región hipervariable denominada E (Capucci, 1998; Oem, 2009). Esta zona, situada en la cápside, contiene la mayor parte de determinantes antigénicos del virus (Alda, 2010), por lo que los cambios a este nivel son responsables de diferencias de tipo inmunógeno. Se ha demostrado que las mutaciones detectables entre RHDV y RCV-A1 son responsables de diferencias en el tropismo celular y la virulencia (Mahar, 2016), y se ha determinado que el incremento en la patogenicidad del RHDVb posiblemente sea debido al mismo fenómeno. No obstante, las mutaciones puntuales no son el único método de evolución de estos calicivirus, ya que se han descrito fenómenos de recombinación entre cepas. Este tipo de alteraciones genéticas se había sugerido, entre genogrupos de RHDV (Forrester, 2006) y se ha descrito recientemente en China, entre G2-G6 (Hu, 2017). Sin embargo, las recombinaciones entre RHDVb y otros virus también se han observado. Como se explica en el apartado 3.3.1.1, el primer caso de recombinación con el RHDVb se describió en la Península Ibérica y dio lugar a la cepa RHDVb-G1 (Almeida, 2015). Esta cepa se detectó poco tiempo más tarde en Australia, donde afectó a conejos tanto silvestres como domésticos (Hall, 2015). El segundo hallazgo de este tipo también tuvo lugar en la Península, y fue la cepa RHDVb-RCV, que junto con el anterior y el RHDVb han desplazado al G1, tradicionalmente aislado geográficamente en la Península (Lopes, 2017). Estos datos muestran cómo el RHDV

⁴⁷ De sus siglas en inglés: *Time to MostRecentCommonAncestor*, *Tiempo del ancestro común más reciente*

presenta una capacidad de evolución rápida y que, a pesar de haber permanecido relativamente estable durante años (Asgari, 1999; Le Gall-Reculé, 2013) es muy probable que experimente cambios, dando lugar a nuevas variantes cuyas características disten bastante de las del virus original.

En este estudio experimental se evaluaron los signos clínicos, hallazgos de necropsia e histopatológicos en conejos infectados experimentalmente con 4 aislados del RHDVb obtenidos en el Norte de España. Nuestro objetivo fue determinar si existían diferencias en la patogenicidad de los 4 aislados, mediante la evaluación de las lesiones macroscópicas e histológicas de los animales. Asimismo, se analizaron los datos clínicos obtenidos durante el período experimental con el objetivo de determinar si la presentación clínica de la enfermedad permitiría predecir la patogenicidad del aislado en estudio.

3. Material y métodos

3.1 Experimentación animal

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la legislación vigente en materia de experimentación animal. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, el Comité de Ética del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y la División de Protección Animal de la Comunidad de Madrid.

En este estudio se seleccionaron 16 conejas no vacunadas de 28 días, procedentes de un centro de multiplicación cuyos protocolos sanitarios son conocidos. El período de cuarentena establecido fue de 5 días. Los animales se alojaron en instalaciones NCB3, por lo que todas las condiciones ambientales permanecieron controladas y estables durante el período experimental. Se estableció un régimen de alimentación con pienso comercial con heno y agua *ad libitum*. El estado de salud de los animales, la presencia de alimento y agua y las condiciones sanitarias del alojamiento eran revisadas dos veces al día por personal especializado. Todos los ensayos fueron realizados por profesionales especializados, prestando especial atención al bienestar animal.

Los animales se alojaron en grupos de 4 conejos, en 4 jaulas adaptadas, una correspondiente a cada inóculo viral. Durante todo el período experimental se tomaron medidas de peso, temperatura y estado general de los animales, a días alternos, y las medidas tomadas durante los días 0-7 se tomaron como control. El día 7, todos los animales fueron infectados con 1mL

del inóculo correspondiente, vía intramuscular. Tras la infección, los animales se monitorizaron a diario con el objetivo de determinar las alteraciones debidas a la infección. Algunos animales que mostraron signos clínicos intensos indicativos de enfermedad fueron eutanasiados mediante sobredosis de barbitúricos⁴⁸, previa sedación por razones humanitarias. Los animales que sobrevivieron a la infección fueron eutanasiados al final del período experimental.

Se realizó la necropsia sistemática de todos los animales, observando su condición corporal, estado general y lesiones macroscópicas. Durante la realización de las necropsias se tomaron muestras de tejidos diana (hígado, bazo, pulmón, riñón) y no diana del virus, con el objetivo de obtener una imagen más amplia sobre la patogenia de la enfermedad en formol tamponado (Merck –100496 | Formaldehído en solución 4%, tamponado, pH 6,9). Los órganos no diana seleccionados para este estudio fueron esófago, intestino, tráquea, corazón, nódulos linfáticos mesentéricos, mediastínicos y poplíteos, timo, glándula adrenal y encéfalo. Todas las muestras se conservaron en formaldehído para su posterior procesado.

3.2 Preparación del inóculo viral

En este estudio se utilizaron 4 aislados de RHDVb obtenidos en el Norte de España durante varios brotes ocurridos en 2014. La preparación del inóculo viral se llevó a cabo mediante un protocolo estandarizado (OIE, 2016) a partir de una suspensión de tejido hepático de animales infectados, en PBS al 10%. Las muestras fueron centrifugadas consecutivamente a 500g durante 20 minutos, y a 6000g durante 30 minutos y el sobrenadante se tituló mediante HA. Los inóculos virales se alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.3 Procesado de las muestras para histología

Las muestras fijadas en formol fueron incluidas en parafina sintética (Casa Álvarez Histo-comp®, ref. CA-09-5658), con un punto de fusión de 56°C, utilizándose un procesador automático de tejidos CITADEL 2000®, con un programa de cambios automáticos de alcoholes de creciente graduación y Citrus ClearingSolvent®. Los bloques fueron realizados en una unidad formadora de bloques, consola HISTOSTAR ThermoScientific®, con placa de frío. Los cortes histológicos se obtuvieron con un microtomo de rotación marca FINESSE ME+ ThermoScientific®, a 3-4 µm de grosor, y un baño de flotación marca FALC Instruments®. Las secciones se desparafinaron en Citrus ClearingSolvent®, se hidrataron en

⁴⁸Dolethal® (Vétoquinol, España)

una serie decreciente de alcoholes y agua en el último paso, empleándose a continuación el método de tinción de Hematoxilina-Eosina convencional. A continuación, se deshidrataron primero en una serie creciente de alcoholes, después se bañaron en Citrus ClearingSolvent® y, finalmente, se montaron con el medio de montaje ClearVue Mount® con base de xileno.

4. Resultados

A partir de las observaciones macroscópicas e histológicas, así como los signos clínicos de los animales, se observaron similitudes en la patogenicidad de los aislados 1-4 y 2-3 del RHDVb.

4.1 Signos clínicos

Durante el período post-infección se observó la presencia de signos clínicos inespecíficos y específicos de la infección en los animales (Tabla X). Dentro de los signos inespecíficos, el primero que se observó fue un incremento de **temperatura** en todos los animales. Este incremento fue máximo en el grupo 4, que alcanzó una media de 1,8°C sobre su temperatura corporal habitual, y fue mínimo en el grupo 2, que se mantuvo cerca de sus valores fisiológicos, incrementando su temperatura una media de 0,1°C. La presencia de *anorexia* se podría evaluar considerando la ganancia de peso de los animales tras la infección, que sólo pudo medirse en los animales de los grupos 2 y 3, ya que los animales de los grupos 1 y 4 murieron antes de las 48 horas post-infección, y la toma de medidas se realizaba a días alternos. El **incremento de peso** observado en estos animales en la primera medición (48 hpi) fue similar al de la semana control, si bien a partir de este momento se observaron disminuciones en el peso de algunos animales y menor incremento de peso en otros. Se observó **congestión conjuntival** en todos los animales de los grupos 1 y 4, y en la mitad de los pertenecientes a los grupos 2 y 3 (Fig. 19).

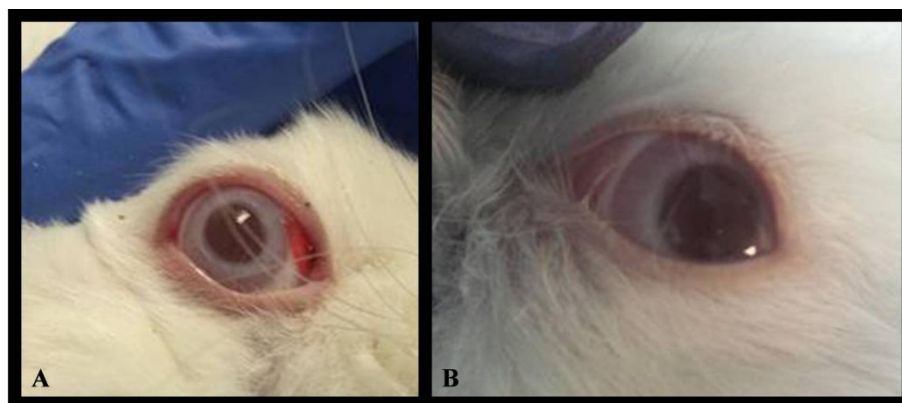


Figura 19. Congestión de la conjuntiva en un conejo afectado por el RHDVb (A). Conjuntiva de un conejo sano (B).

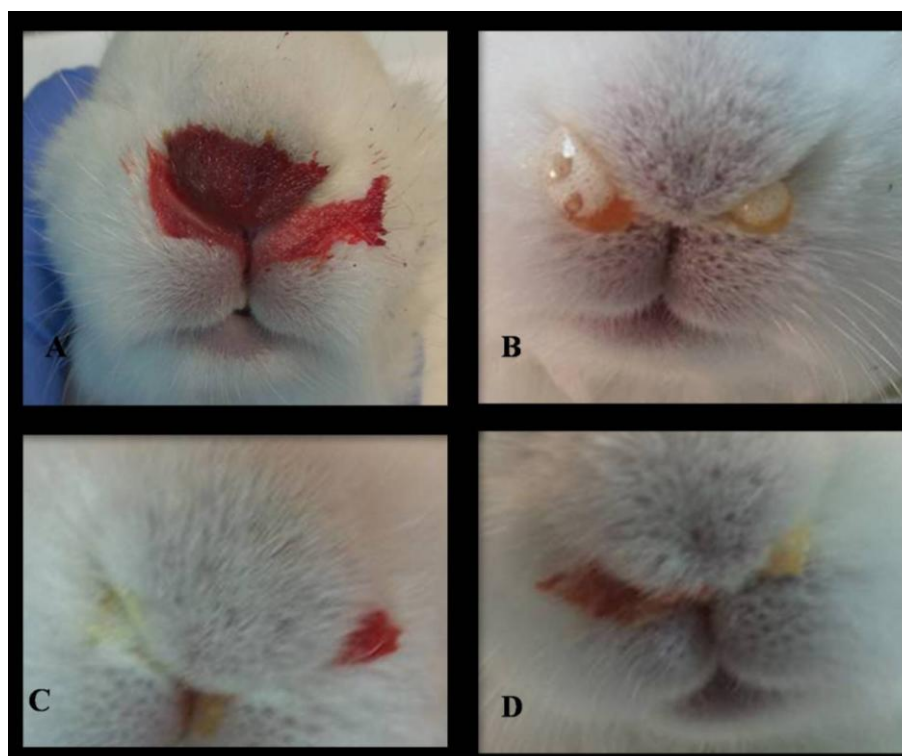


Figura 20. Diferentes grados de epistaxis observados en animales afectados por el virus. (A) Epistaxis profusa. (B) Exudado nasal espumoso, sero-sanguinolento. (C, D) Exudado nasal mixto, seroso-mucoso y sanguinolento.

Tabla X. Signos clínicos observados en los animales de los grupos 1-4.

SIGNOS CLÍNICOS	1	2	3	4
INCREMENTO TEMPERATURA (°C)	0.6	0.1	1.1	1.8
CONGESTIÓN CONJUNTIVAL	100	50	50	100
ICTERICIA (%)	0	100	0	0
HORAS POST-INFECCIÓN (MORTALIDAD)	24-36	48-60	>72	36-48
OPISTOTONOS (%)	75	50	0	100
EPISTAXIS (%)	75	0	33	75
ASCITIS (%)	50	0	0	0
LÍQUIDO EN CAVIDAD TORÁCICA (%)	50	25	25	50

Se observaron **signos esporádicos de tipo nervioso**, como postración, ataxia, y vocalizaciones en algunos animales. Los animales pertenecientes a los grupos 1 y 4 murieron antes de 48 hpi, mientras que el resto de los grupos mostró un cuadro clínico más largo, superando las 72 horas en el grupo 3. La presencia de **opistótonos** es un rasgo específico de la

infección por RHDV, que se caracteriza por rigidez y arqueamiento severo de la columna vertebral. Este signo se observó en todos los animales del grupo 4 y el 75% del grupo 1. El signo más específico de la enfermedad hemorrágica es la aparición de **epistaxis** que, en este estudio, se detectó en el 75% de los animales pertenecientes a los grupos 1 y 4 (Fig. 20).

4.2 Lesiones macroscópicas

Se realizó la necropsia de todos los animales con el objetivo de determinar la presencia de alteraciones macroscópicas relevantes. Los hallazgos observados se describen a continuación (Tabla XI).

4.2.1 Órganos diana

En todos los ensayos de las diferentes variantes de RHDVb se observó que los órganos diana del virus fueron el hígado, bazo, riñones y pulmones. El hígado es el principal órgano diana del virus y en él se produce la replicación viral ocasionando lesiones tisulares severas. Se observó hepatomegalia en 3 de los 4 grupos, con frecuencias superiores al 50% en todos los casos. Los animales pertenecientes al grupo 3 no mostraron incrementos observables en el tamaño de este órgano (Fig.22; 24). Macroscópicamente, se observó la presencia de áreas de coloración pálida en la superficie hepática y un marcado patrón lobulillar en todos los grupos, con frecuencias que oscilaban entre 50-100% (Fig. 25). En algunos casos, la consistencia friable del órgano fue un hallazgo destacable.



Figura 21. Cavidad abdominal de un gazapo infectado por el RHDVb. Se aprecia una marcada congestión orgánica, así como una ligera hepatomegalia y esplenomegalia.

En cuanto al bazo, en todos los grupos se observaron diferentes grados de esplenomegalia y congestión esplénica. En el grupo 4, todos los animales mostraron un considerable aumento de tamaño de este órgano.

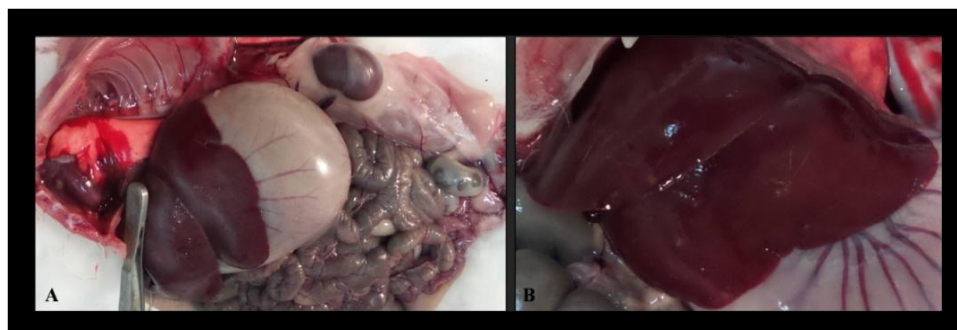


Figura 22. Imagen macroscópica de las cavidades orgánicas de un conejo no infectado por el RHDVb, donde se aprecia la coloración uniforme y rojiza del hígado (A). Detalle de la superficie hepática de un conejo sano (B).

La mayor parte de los animales presentaba además una intensa congestión renal a nivel cortical y medular. En el caso del grupo 1, se observó la presencia de petequias y hemorragias internas en los riñones del 50% de los animales. Los pulmones mostraron la mayor frecuencia de lesiones observadas en este estudio. Se apreció una marcada congestión, focos de hemorragia y edema pulmonar en todos los grupos, con frecuencias superiores al 50% (Fig. 24; 28).

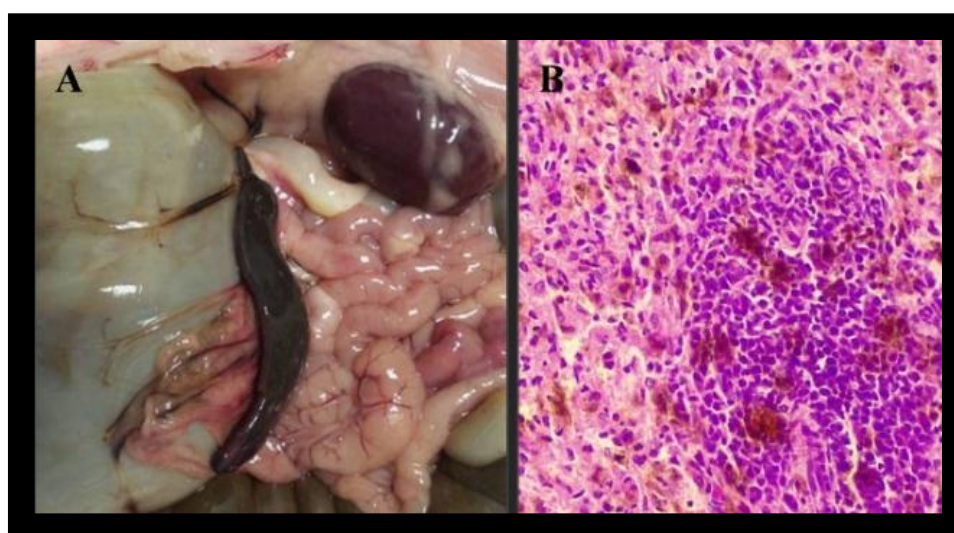


Figura 23. Imagen de la cavidad abdominal (A) donde se aprecia el incremento en el tamaño relativo del bazo. (B) Imagen microscópica del tejido esplénico en la que se observan signos de hemosiderosis. H&E. 20x

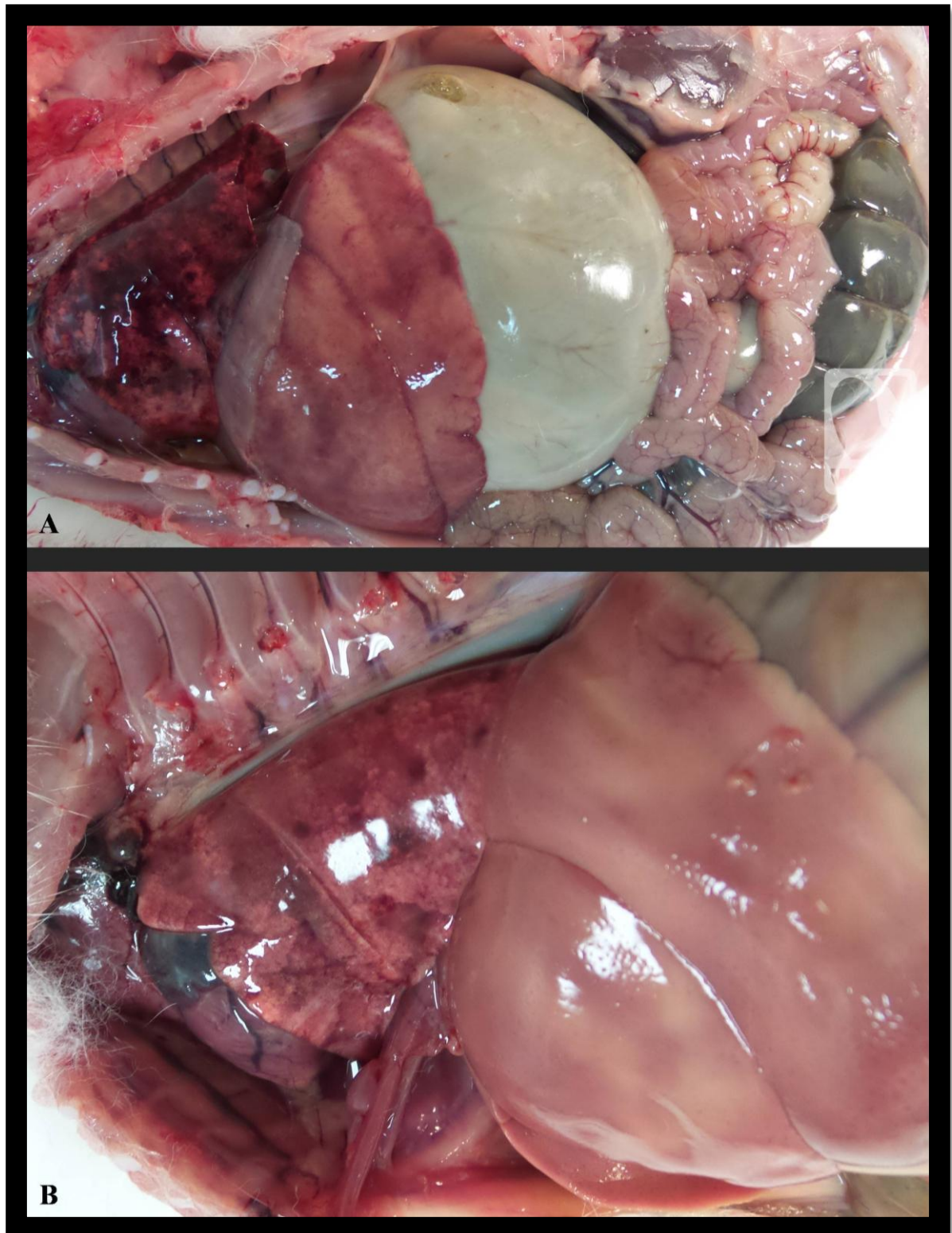


Figura24. Imagen macroscópica de la cavidad celómica de un conejo infectado con RHDVb. . (A) Se aprecia una intensa hepatomegalia asociada con una fuerte decoloración de la superficie hepática (áreas de necrosis). Los pulmones muestran una superficie de coloración oscura e irregular, con presencia de numerosas hemorragias en la superficie pleural. Presencia de abundante líquido ambarino libre en cavidad torácica . (B)

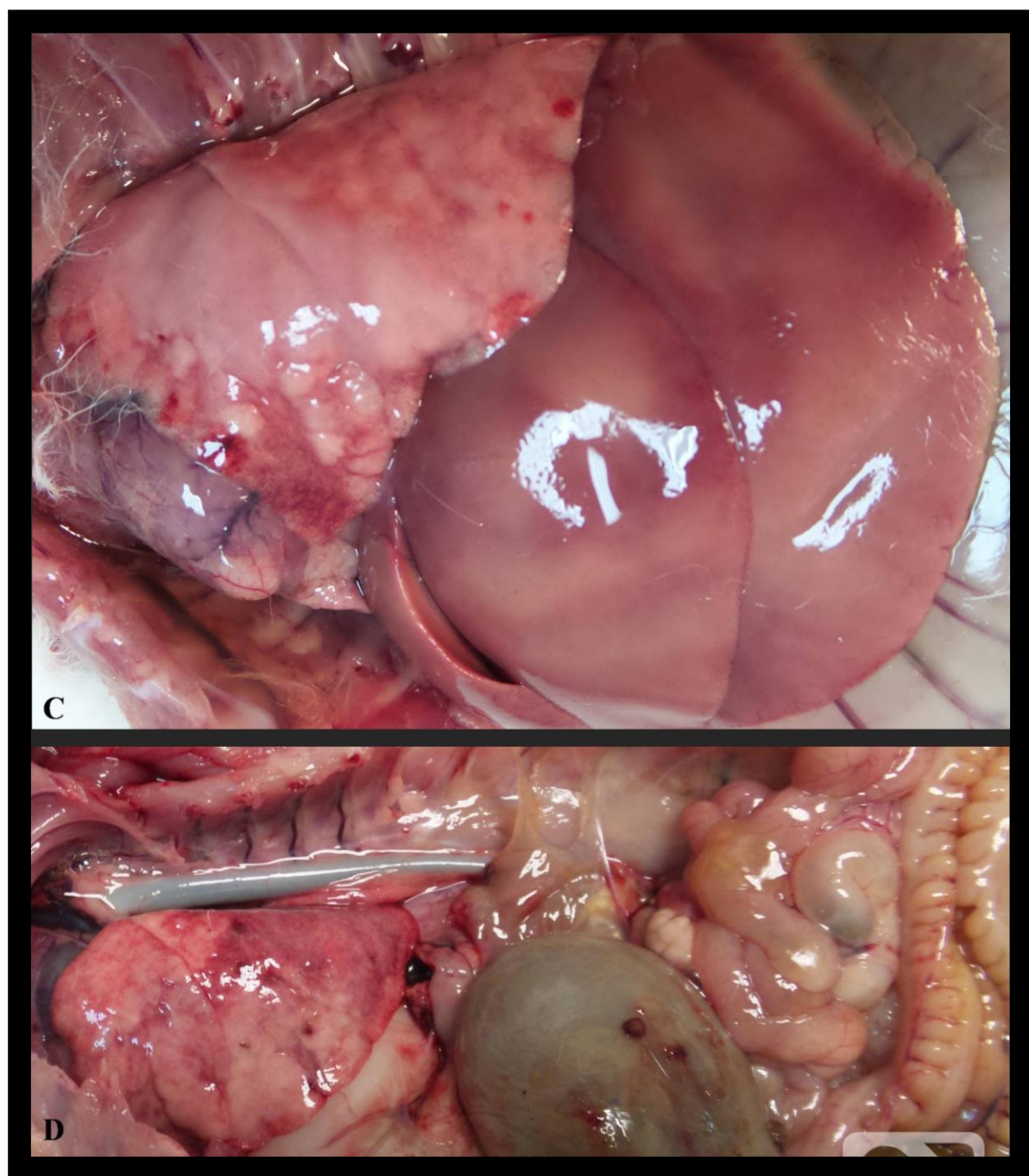


Figura 24. Imagen macroscópica de la cavidad celómica de un conejo infectado con RHDVb (C) La coloración de la superficie hepática se muestra parcheada y se aprecia hepatomegalia. Los pulmones aparecen no colapsados, con dibujo lobulillar marcado por el edema septal, mostrando una coloración clara sobre la que destacan la presencia de abundantes petequias. . Se aprecia congestión cardíaca. (D) Aspecto de la cavidad visceral tras retirar el hígado. El pulmón presenta una coloración irregular acompañada de focos prominentes de enfisema que se alternan con zonas deprimidas de atelectasia. Presencia de focos de hemorragia en la serosa gástrica e intestinal.

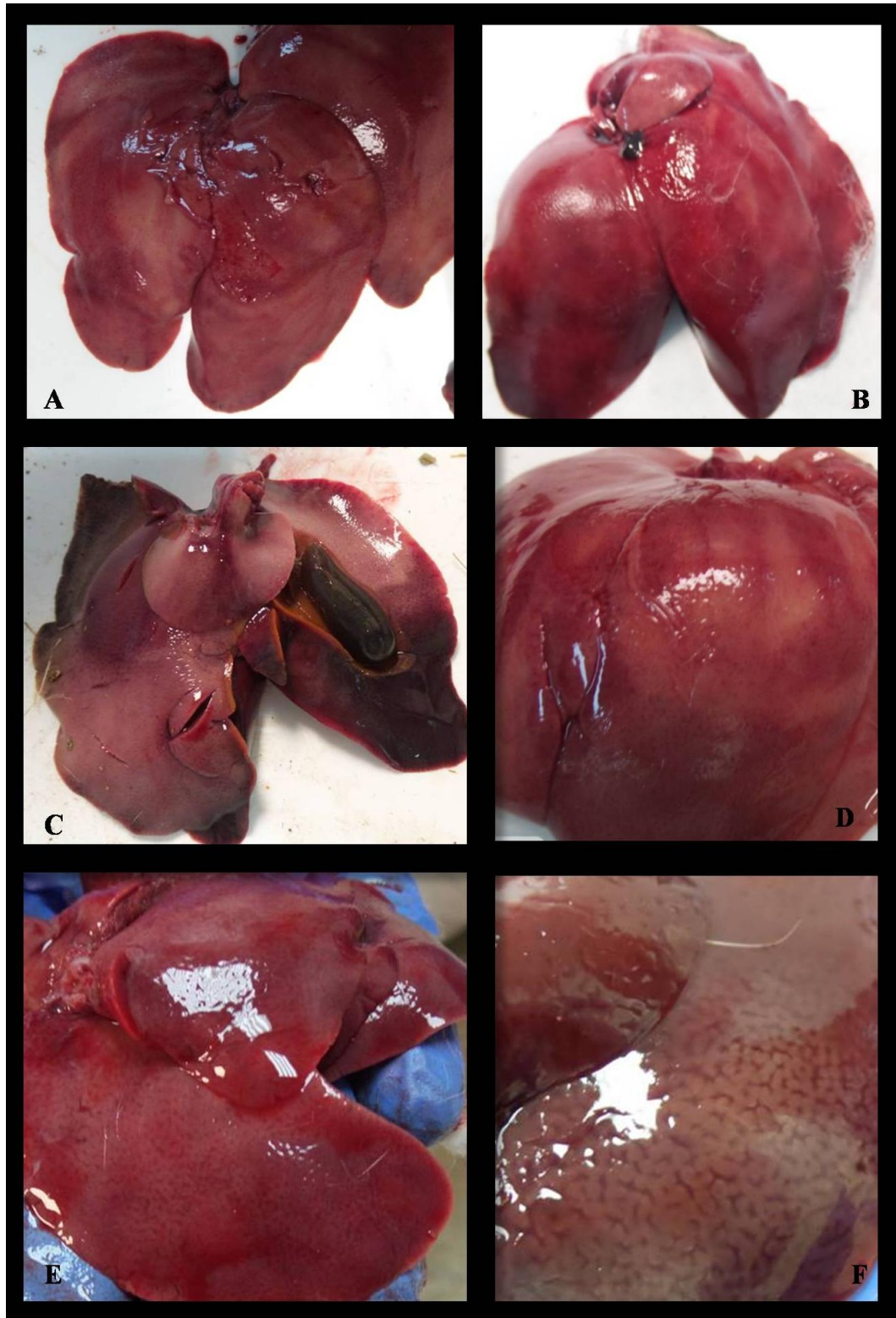


Figura 25. Aspecto macroscópico del hígado de 4 animales infectados por el RHDVb. Se observa incremento de tamaño del órgano (A, B, D), textura friable (A, B), decoloración superficial difusa tanto en la cara parietal (A, B, D) como visceral (C) y patrón lobulillar marcado (E, F). Este hallazgo es recurrente en animales infectados por el virus.

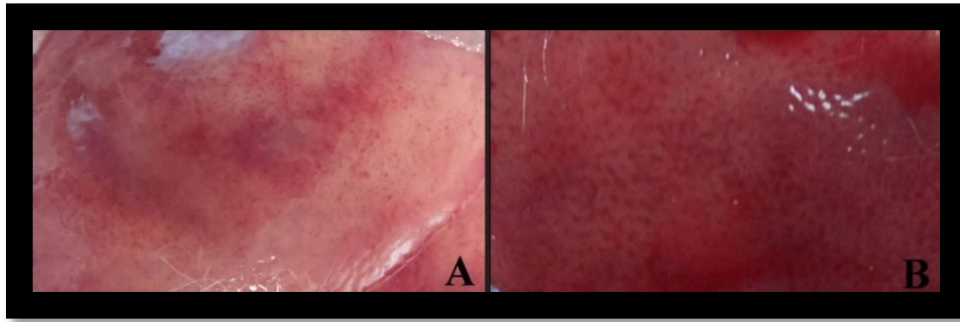


Figura 26. Detalle de la superficie hepática de conejos infectados por el RHDVb. Se aprecian áreas de necrosis (A), así como un patrón lobulillar superficial (A, B).

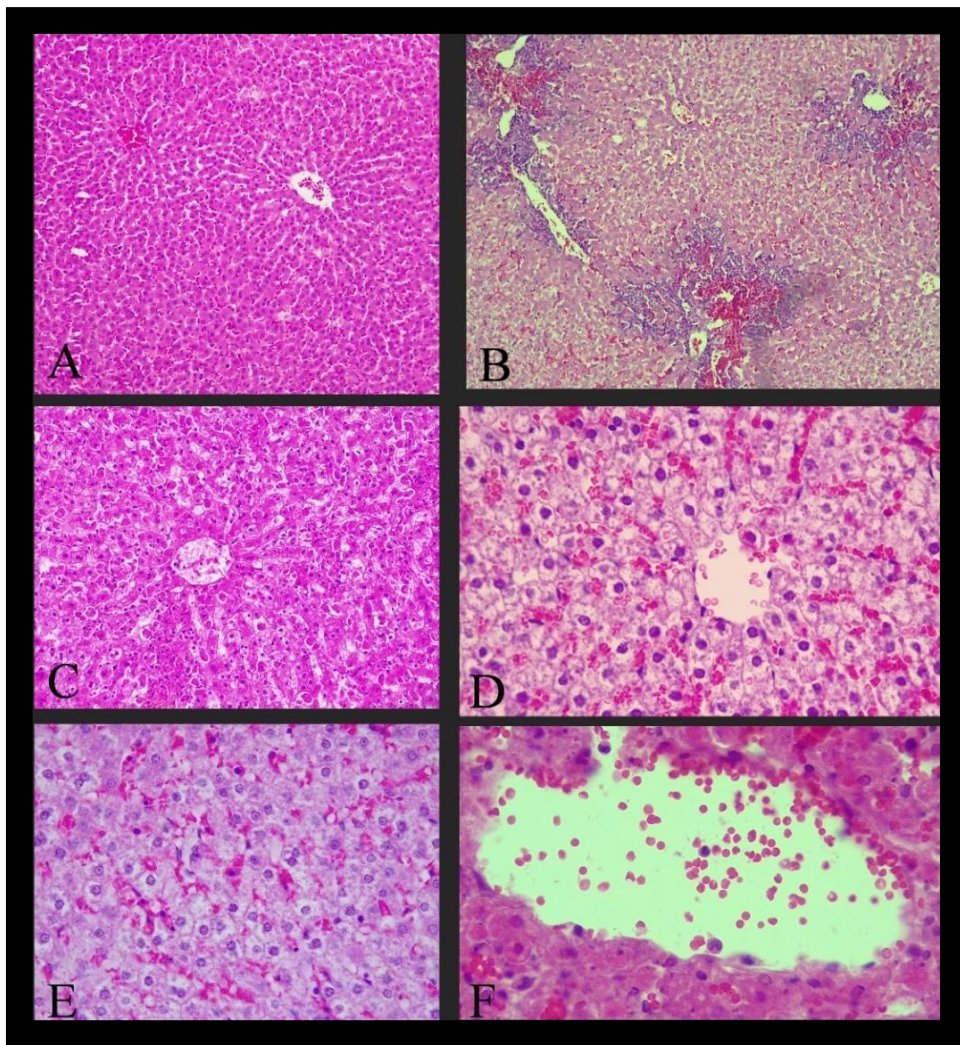


Figura 27. Imágenes microscópicas del parénquima hepático: (A) Tejido hepático sano. H&E. 4x (B) Necrosis hepática causada por el RHDVb. H&E. 2,5x (C,D) Microvacuolización de los hepatocitos con pérdida de la estructura lobulillar. H&E. 4x y 40x

(E) Detalle de los hepatocitos en diferentes fases de degeneración hidrópica con microvacuolización citoplásmica. Se aprecia congestión sinusalr. H&E. 20x (F) Detalle de la vena centrolobulillar con marcada congestión. H&E. 20x.

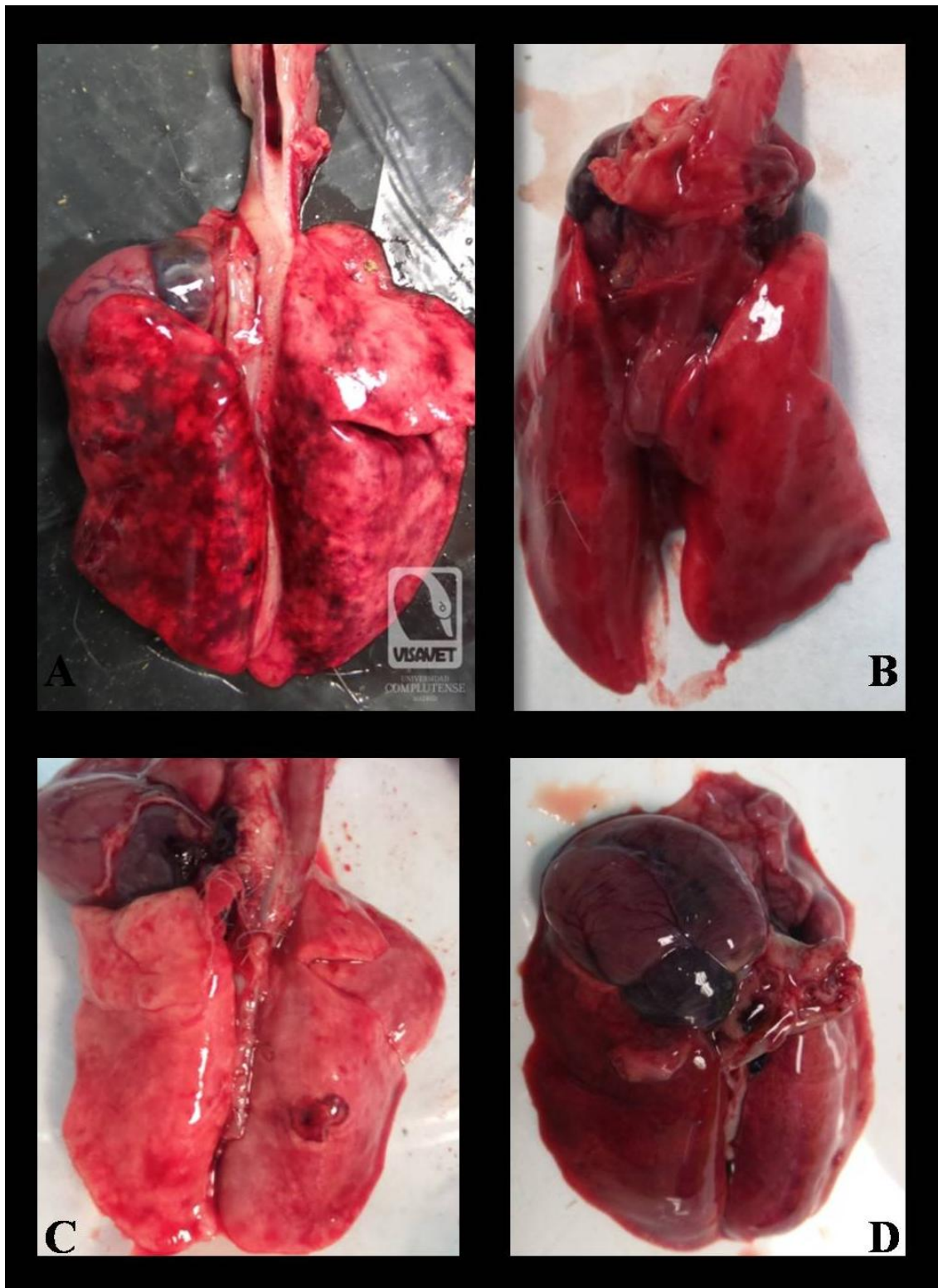


Figura 28. Imagen macroscópica de corazón y pulmones de 4 animales afectados por RHDVb. Se aprecia cómo los pulmones no aparecen colapsados (pulmón de shock). Imagen parcheada con coloración irregular de la superficie pulmonar (A,C) con presencia de abundantes focos de hemorragia.) Intensa congestión (B, D). El corazón muestra congestión vascular en todos los casos.

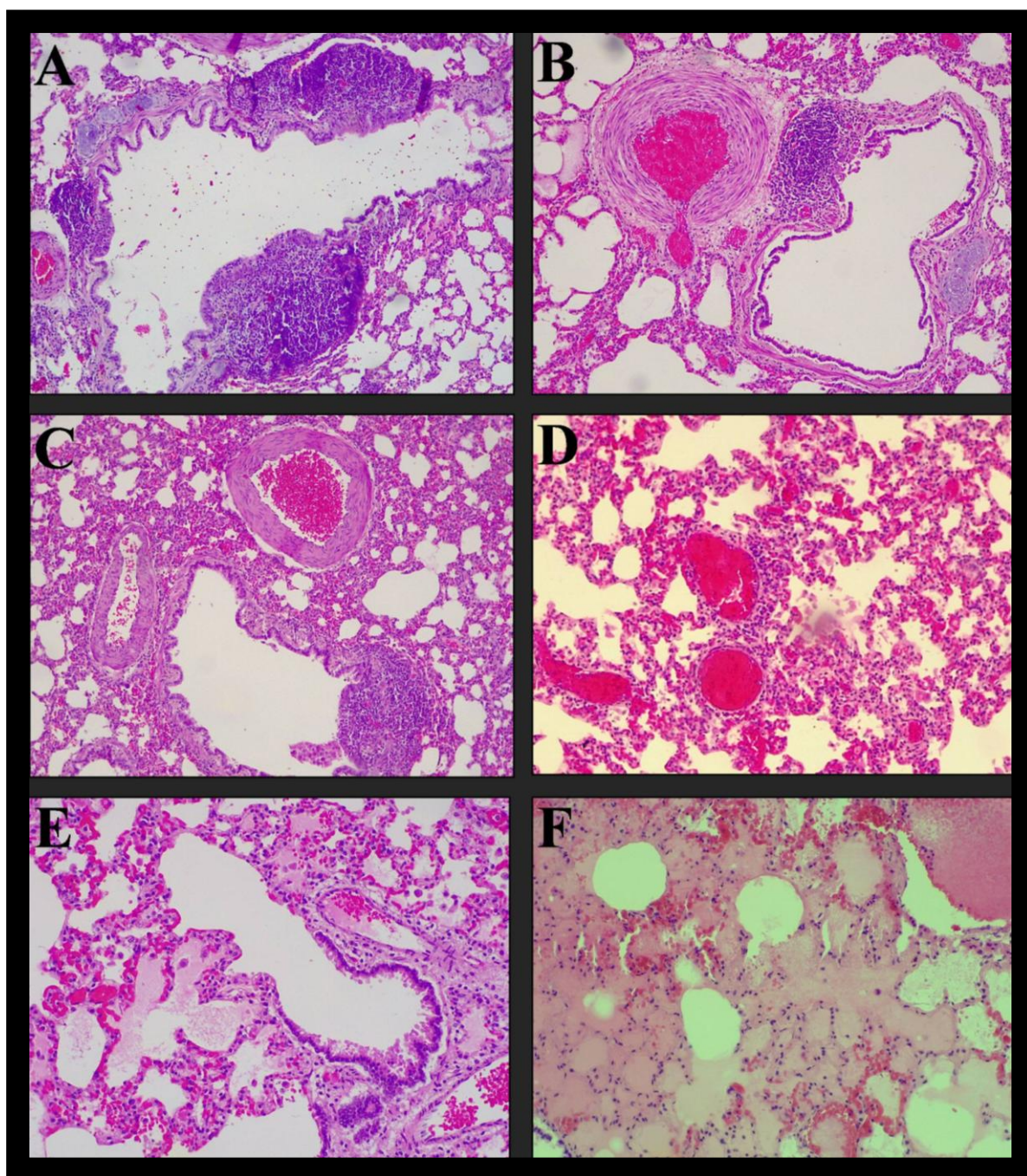


Figura 29. Imágenes microscópicas de pulmón de animales infectados por el RHDVb. Se aprecia activación del tejido linfoide asociado a bronquios (A); (A,B,.H&E. x4) Engrosamiento de la túnica adventicia de los vasos (B,C). H&E. x4. Marcado engrosamiento de los tabiques interalveolares, congestión (A,B,C,D,E) y edema (E,F). Imagen de shock pulmonar (E, F).H&E. x10

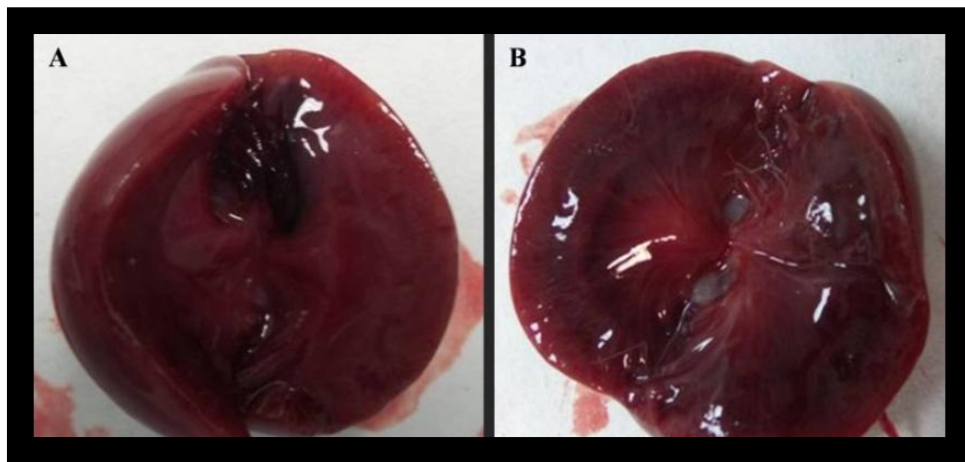


Figura 30. Riñones afectados por el virus. Se aprecia congestión severa de cortical y medular (A, B)

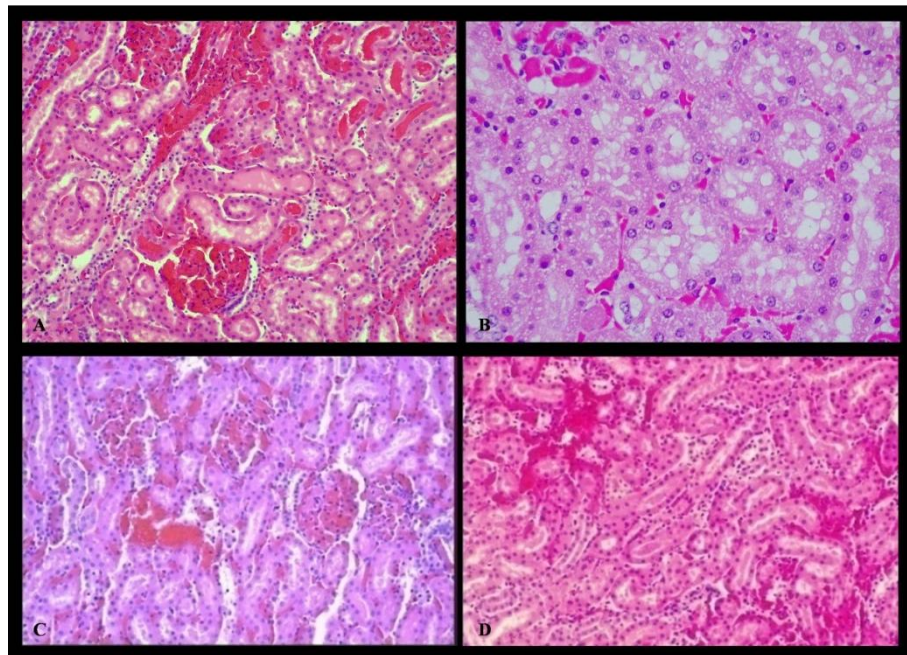


Figura 31. Imágenes histológicas de riñón.. Se aprecia congestión vascular e intensa hemorragia intersticial (A, B, C, D), H&E. x4; Cilindros hialinos (A, D), y degeneración vacuolar citoplásmica con presencia de algunas células epiteliales en fase de necrosis (, B).H&E. x10

4.2.2 Otros órganos

Se observó congestión vascular en el estómago e intestinos de los animales infectados con los 4 aislados virales, en un porcentaje superior al 50% en todos los casos. El corazón mostraba congestión en más del 50% de los animales pertenecientes a 3 de los 4 grupos, y

lesiones hemorrágicas en 2 de los 4 grupos. El timo apareció congestivo con hemorragias en la mitad de los animales pertenecientes a 2 de los 4 grupos. Se observó la presencia de congestión y hemorragias, de forma simultánea, en el encéfalo de la mitad de los animales infectados con el aislado 4, mientras que no se detectaron estas lesiones en el resto de los grupos.

Tabla XI. Hallazgos macroscópicos en los animales de los grupos 1-4 (%).

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS (%)	1	2	3	4
HEPATOMEGALIA	50	100	0	100
PATRÓN LOBULILLAR	100	50	50	100
HÍGADO FRIABLE	50	0	50	0
ESPLENOMEGALIA	50	50	0	100
CONGESTIÓN RENAL	100	0	100	100
HEMORRAGIAS-PETEQUIAS RENALES	50	0	0	0
CONGESTIÓN PULMONAR	100	100	50	100
HEMORRAGIAS PULMONARES	100	50	100	100
EDEMA DE PULMÓN	100	100	50	50
CONGESTIÓN CARDÍACA	50	0	100	100
HEMORRAGIAS CARDÍACAS	50	0	0	100
LINFONÓDULOS MESENTÉRICOS ALTERADOS	50	100	50	100
LINFONÓDULOS MEDIASTÍNICOS ALTERADOS	50	50	50	50
LINFONÓDULOS POPLÍTEOS ALTERADOS	50	50	50	100
CONGESTIÓN-HEMORRAGIA TÍMICA	0	0	50	50
CONGESTIÓN ENCEFÁLICA	50	0	0	0
HEMORRAGIA ENCEFÁLICA	50	0	0	0
CONGESTIÓN VASCULAR DIGESTIVA	50	50	100	50

Se estudiaron varios linfonódulos con el objetivo de evaluar si la distribución viral provocaba lesiones en las localizaciones correspondientes. Los linfonódulos mesentéricos aparecían aumentados de tamaño y mostraban congestión en más del 50% de los animales de todos los grupos. Los linfonódulos mediastínicos presentaron estos signos en la mitad de los

animales de todos los grupos. El linfonódulo poplíteo presentaba congestión e incremento de tamaño en todos los grupos, apareciendo en el 100% de los animales del grupo 4 (Fig. 32).

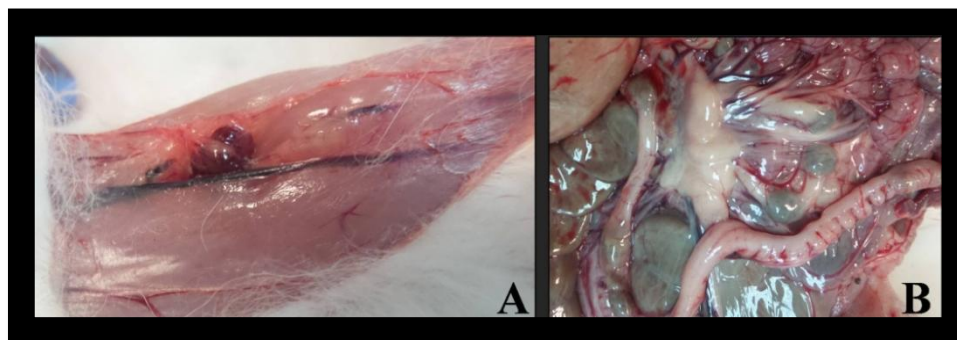


Figura 32. Linfonódulo poplíteo de un conejo infectado por el RHDVb (A). Se observa congestión e incremento de tamaño. (B) Linfonódulos mesentéricos de un conejo afectado por el virus con marcada hipertrofia..

4.3 Hallazgos microscópicos

4.3.1 Órganos diana

El principal hallazgo histológico en el hígado de estos animales fue una necrosis severa, que se observó en todos los animales. Se apreció un patrón de necrosis centrolobulillar a mediozonal en los grupos con curso clínico más corto (1 y 4), mientras que en los grupos de curso clínico más largo (2 y 3) fue más frecuente la presencia de microvacuolización intracitoplasmática. La estructura del órgano aparecía alterada en el 50-75% de los animales pertenecientes a todos los grupos, con grados de degeneración de la estructura lobulillar de moderado a intenso en los grupos 1 y 4. Además de estas lesiones, se observaron congestión, hemorragias y trombosis con frecuencias del 25-50% en todos los grupos (Fig. 27). El bazo mostraba signos de congestión en 3 de los 4 grupos, y hemosiderosis en el grupo 1. Se observaron signos de depleción linfóide de grado variable en más del 50% de los animales pertenecientes a 3 de los 4 grupos.

La principal lesión renal observada fue la aparición de hemorragias en la mayor parte de los animales a nivel intersticial. Se observó necrosis tubular en más del 50% de los animales de todos los grupos, siendo mayor en los grupos 1 y 4, al igual que la presencia de daño glomerular, que mostraba porcentajes similares (glomerulonefritis membranosa). Se encontraron gotas y cilindros hialinos en 3 de los 4 grupos, alcanzando un 75% de los casos en el grupo 4 (Fig. 31).

El tejido pulmonar mostraba lesiones características de shock que se caracterizan por marcada congestión vascular, así como focos de hemorragia y marcado edema a nivel del espacio alveolar. Estos hallazgos se observaron en más del 50% de los animales pertenecientes a todos los grupos, siendo especialmente significativos en los grupos 1 y 4. Se observó engrosamiento de los tabiques interalveolares en todos los grupos, con porcentajes de presentación coincidentes con la presencia de infiltrados inflamatorios. Estos hallazgos fueron especialmente significativos en los grupos 2 y 3. De forma esporádica, se encontraron signos de microtrombos vasculares (Fig. 29).

Tabla XII. Hallazgos histológicos en los animales de los grupos 1-4 (%).

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS (%)	1	2	3	4
HEMORRAGIA HEPÁTICA	0	50	50	50
CONGESTIÓN HEPÁTICA	50	50	50	25
NECROSIS HEPÁTICA	100	100	100	100
ALTERACIÓN ESTRUCTURAL HEPÁTICA	75	50	50	75
TROMBOSIS HEPÁTICA	25	50	0	50
VACUOLIZACIÓN DE HEPATOCITOS	75	100	100	75
CONGESTIÓN ESPLÉNICA	50	0	100	50
HEMOSIDEROSIS ESPLÉNICA	50	0	0	0
DEPLECIÓN LINFOIDE EN BAZO	50	0	50	75
HEMORRAGIA RENAL	100	50	100	100
NECROSIS TUBULAR RENAL	75	50	50	75
GOTAS/CILINDROS HIALINOS	25	0	50	75
DAÑO GLOMERULAR	75	50	50	75
HEMORRAGIA PULMONAR	75	50	100	100
CONGESTIÓN PULMONAR	100	50	50	75
EDEMA PULMONAR	100	50	100	50
ENGROSAMIENTO DE TABIQUES INTERALVEOLARES	75	100	100	50
INFILTRADO INFLAMATORIO PULMONAR	75	100	100	25
EROSIÓN EPITELIO PULMONAR	25	50	0	50
SIGNOS DE HIPERTENSIÓN	0	0	100	50
TROMBOSIS PULMONAR	50	0	50	25
HEMORRAGIA CARDÍACA	25	0	50	75

HEMORRAGIA-CONGESTIÓN DE LINFONÓDULOS	0	0	0	75
HISTIOCITOSIS SINUSAL	0	50	0	0
DEPLECIÓN LINFOIDE	25	50	0	25
HEMORRAGIA-CONGESTIÓN TÍMICA	50	100	100	75
DEPLECIÓN LINFOIDE EN TIMO	50	50	50	25
HEMORRAGIA ENCEFÁLICA	0	0	0	25
NECROSIS ISQUÉMICA	0	0	0	25
HEMORRAGIA-CONGESTIÓN TRAQUEAL	0	50	0	0
INFLAMACIÓN LINFOIDE TRAQUEAL	0	0	0	25
EROSIÓN TRAQUEAL	50	50	0	25
EROSIÓN ESOFÁGICA	0	50	50	0
HEMORRAGIA INTESTINAL	0	0	50	50
EROSIÓN INTESTINAL	100	100	100	100
INFLAMACIÓN INTESTINAL	0	50	50	50

4.3.2 Otros órganos

Se observaron hemorragias en el músculo cardíaco en 3 de los 4 grupos, con frecuencias de presentación que alcanzaron el 75% en el grupo 4. Los linfonódulos (mesentéricos, mediastínicos, poplíteos) presentaban lesiones de tipo congestivo-hemorrágico en el 75% de los animales del grupo 4, mientras que esta lesión no se apreciaba en el resto de los grupos. La mitad de los animales pertenecientes al grupo 2, mostraron histiocitosis sinusal. La presencia de depleción linfoide fue esporádica en los grupos 1 y 4, observándose en el 25% de los animales, y alcanzó el 50% en el grupo 2.

Se observaron signos de congestión en el timo en animales de todos los grupos, superando el 50% en todos los casos (Fig. 34). La depleción linfoide en este órgano oscilaba alrededor del 50% en todos los grupos. No se observaron lesiones encefálicas, exceptuando la aparición de hemorragias de forma esporádica en animales del grupo 4.

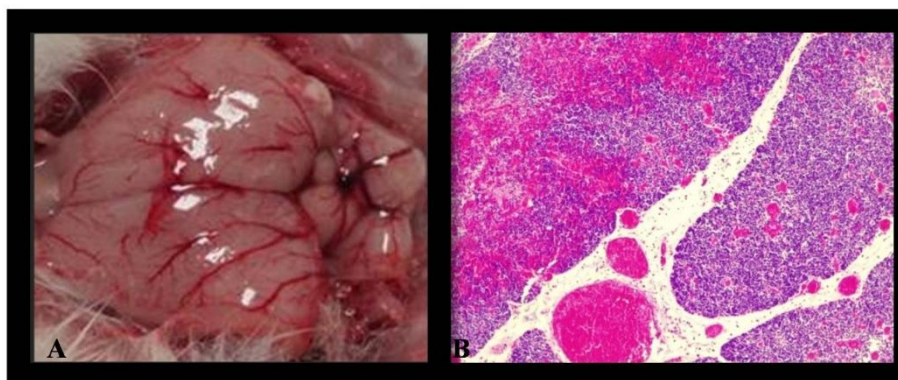


Figura 33. Encéfalo de un animal infectado por el RHDVb, donde se observa congestión vascular y lesiones de tipo hemorrágico multifocal a nivel de la meninge (A). Imagen microscópica del timo de un animal infectado por el virus (H/E) que muestra congestión y hemorragia intensas a nivel medular con depleción linfoide. H&E. x2.

A nivel digestivo, se observaron lesiones de tipo erosivo en todos los animales, así como hemorragias e inflamación que alcanzaron porcentajes del 50% de los animales en 3 de los 4 grupos. En la tráquea, se observaron porcentajes de erosión epitelial del 25-50% en 3 de los 4 grupos, así como lesiones de tipo hemorrágico-congestivo de forma esporádica. En los animales del grupo 4, se observó dilatación y congestión de los conductos linfoides en el 25% de los casos (Fig. 33).

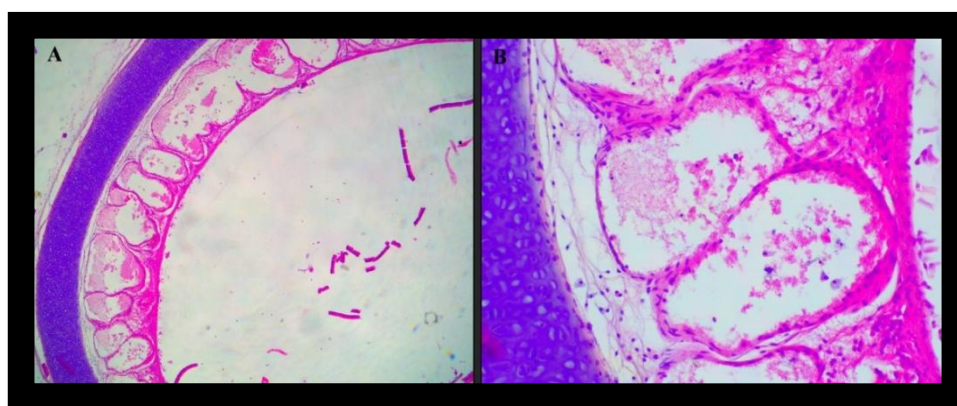


Figura 34. Imagen histológica de la tráquea de un animal afectado por el RHDVb. Se observa denudación ciliar epitelial con marcada dilatación de las glándulas mucosas traqueales con pequeños (A), y grandes aumentos (B). H&E. x2 y x10.

5. Discusión

En este estudio se analizan los signos clínicos y lesiones macroscópicas e histológicas producidas por 4 aislados de RHDVb sobre gazapos de 28 días. Los resultados obtenidos a partir de la infección experimental muestran diferencias en el comportamiento de los aislados desde el punto de vista clínico. Se observa que los aislados 1 y 4 producen un cuadro clínico de curso más rápido, con desenlace fatal antes de 48 horas post-infección, a diferencia de los

aislados 2 y 3, que producen mortalidad en los animales tras un curso clínico que llega a superar las 72 horas. Los grupos 1 y 4, muestran además la mayor frecuencia de presentación de opistótonos, uno de los signos característicos de la infección por el virus, así como las mayores tasas de presentación de epistaxis, que en estos casos aparece de forma profusa, al contrario que en los grupos 2 y 3, donde su aparición es mucho menos intensa y de tipo sero-sanguinolento o espumoso. Los animales pertenecientes a todos los grupos mostraron signos inespecíficos, tales como fiebre, anorexia y apatía, sin que se pueda relacionar la intensidad de estos síntomas con los aislados responsables.

Los hallazgos macroscópicos revelaron hepatomegalia en los animales pertenecientes a todos los grupos, con menor incidencia en el grupo 3. La presencia de coloración pálida en la superficie del órgano es un signo indicativo de la infección por el virus, y fue un hallazgo recurrente en los animales infectados con los 4 aislados. La esplenomegalia observada en los animales es también un signo indicativo de la infección por el virus, y muestra mayor frecuencia de aparición en los grupos 1 y 4, respecto al 2 y 3. La presencia de congestión renal fue un hallazgo generalizado de necropsia, exceptuando los animales pertenecientes al grupo 2, en que no se detectó este signo.

Las lesiones observadas a nivel pulmonar fueron variadas, destacando la imagen de pulmón de shock caracterizado por la presencia de congestión, hemorragias y edema pulmonar en la mayor parte de los grupos. La imagen macroscópica de los pulmones muestra amplias y difusas hemorragias en la superficie del órgano.

En el caso de los órganos periféricos, no diana del virus, se observaron fundamentalmente alteraciones de tipo hemodinámico, derivadas de la CID producida por el virus. Los órganos periféricos mostraron una intensa congestión vascular, que resultó evidente en el tracto digestivo, aunque también se observó en el corazón y el encéfalo, fundamentalmente de los animales infectados por el aislado 4. El estudio de los linfonódulos mostró un incremento de tamaño generalizado tanto en los nódulos mesentéricos como mediastínicos, y una moderada congestión. En el caso de los linfonódulos poplíteos, los animales infectados con los aislados 1 y 4 mostraron las mayores tasas de congestión y linfadenomegalia. Esta alteración de los órganos linfoides se debe a la diseminación del virus hacia los tejidos orgánicos y a la movilización del sistema inmune como respuesta a la infección. Las lesiones observadas en los órganos diana, junto con los signos clínicos y post-mortem observados en los animales, son suficientes para ofrecer un diagnóstico presuntivo de infección por el RHDV.

El estudio histológico del tejido hepático mostró necrosis severa en la mayor parte de los animales, siendo más frecuente la presentación centrolobulillar a mediozonal. Las áreas de necrosis mostraban infiltrados inflamatorios periféricos, así como congestión severa, hemorragias y trombosis. La microvacuolización del citoplasma de los hepatocitos (degeneración hidrópica) fue un hallazgo frecuente que mostró diferentes grados de intensidad en los distintos grupos. Las lesiones provocadas en los hepatocitos muestran como consecuencia la disrupción de la estructura del órgano, con pérdida de continuidad intercelular, alteración de los cordones celulares y los sinusoides hepáticos, y alteración severa de la función del órgano, como se deduce de los signos clínicos.

La lesión más relevante encontrada en el bazo fue la depleción linfoide, como se esperaba debido a la infección por el virus, y como se observó en los linfonódulos y el timo. Además se observó congestión intensa del órgano en la mayor parte de los casos. El tejido renal mostraba una severa congestión, con presencia de hemorragias. Debido al elevado nivel de irrigación de este órgano, al igual que el bazo, las alteraciones hemodinámicas derivadas de la infección muestran importantes consecuencias a este nivel. El hallazgo más relevante en el tejido renal fue la necrosis tubular y el daño glomerular (glomerulonefritis membranosa), observados con mayor frecuencia en los grupos 1 y 4. Como consecuencia de las lesiones celulares ocasionadas por el virus, se produce una pérdida de sustancia proteica que da lugar a las gotas hialinas observadas. Los signos de daño renal son indicativos de disfunción orgánica que, en este caso, cursa con alteraciones en la filtración/reabsorción del órgano y puede provocar un cuadro tóxico. La gravedad de las lesiones hepáticas y renales, y las alteraciones que derivan de la disfunción de estos órganos (hipoglucemia, uremia, incremento de creatinina hemática, desequilibrio electrolítico) serían suficientes para justificar la presencia de signos neurológicos en el animal y, en caso de ser sostenidos, podrían producir la muerte. Las lesiones observadas en el tejido pulmonar contribuyen al cuadro descrito, al observarse signos de edema y congestión, que son predominantes en los grupos 1 y 4, y que dificultan considerablemente la respiración de los animales. En el caso de la tráquea, es destacable la presencia de dilatación y congestión de los vasos linfáticos a nivel de la lámina propia y la presencia de erosiones en el epitelio respiratorio (pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes) en algunos de los animales. Esta observación podría justificarse por la afinidad que muestra el virus hacia este tejido (epitelio respiratorio), al ser uno de los lugares de entrada al organismo (Nyström, 2011) y que podría lesionar al interactuar con sus células epiteliales.

Los resultados de este trabajo sugieren la existencia de diferentes grados de patogenicidad entre los aislados estudiados, que podrían agruparse de manera preliminar en un grupo de mayor patogenicidad o virulencia, formado por los aislados 1 y 4, y un segundo grupo, de menor patogenicidad, formado por los aislados 2 y 3. Los calicivirus son virus muy variables, y se ha determinado que el RHDVb muestra una mayor patogenicidad en la actualidad respecto a la que presentaba hace algunos años (Capucci, 2017). La evolución del virus hacia variantes más patógenas es una hipótesis que podría explicar la presencia de diferentes presentaciones clínicas entre estos aislados. No obstante, la aparición de aislados recombinantes RHDVb-G1 (Almeida, 2015) en la Península en el mismo período en que se obtuvieron los aislados de este estudio es un aspecto a considerar, ya que los datos laboratoriales de tipo cualitativo (datos no publicados) de estos aislados, muestran resultados diagnósticos coincidentes con RHDVb y RHDV, lo que sugiere la posibilidad de un fenómeno de recombinación. La caracterización genética de estos aislados es fundamental para determinar si la mayor virulencia observada en los aislados 1 y 4 podría ser debida a su identificación como cepas recombinantes.

6. Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran la aparición de lesiones severas en hígado, bazo, riñón y pulmón de los animales infectados con el RHDVb, así como la presencia de alteraciones hemodinámicas y linfoproliferativas en órganos periféricos. La presencia de erosiones en el epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado que cubre la tráquea sugiere la afinidad de estos aislados por el epitelio respiratorio, como se podría deducir de las lesiones observadas a nivel pulmonar. Las observaciones macroscópicas indican una mayor severidad en las lesiones orgánicas producidas por los inóculos 1 y 4, en concordancia con los datos clínicos obtenidos del estudio, que muestran mayor rapidez en la instauración del cuadro clínico y mayor profusión de lesiones en estos animales. Los datos histológicos obtenidos a partir del estudio de los tejidos diana del virus justifican el cuadro clínico observado, así como el desenlace fatal de la enfermedad. La caracterización genética de estos aislados podría determinar si existen diferencias que justifiquen las distintas presentaciones clínicas que muestran, así como su posible identificación como cepas recombinantes.

VIII. DISCUSIÓN

1. Evaluación de una nueva vacuna frente al RHDVb en gazapos

El RHDVb es un agente patógeno que afecta a conejos menores de 2 meses con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad (OIE, 2016). La importancia del virus radica en su afinidad por los animales jóvenes, que son el reemplazo poblacional esencial en el medio ambiente, así como la reposición en las explotaciones cunícolas. Además de afectar a los gazapos, este nuevo virus es capaz de infectar a conejos adultos vacunados frente a la variante clásica de la enfermedad, debido a la ausencia de protección cruzada entre ambos virus. Este fenómeno no es extraño, sino que resultaba predecible. Los estudios de protección cruzada entre calicivirus han sido un elemento constante en la investigación desde hace décadas. Tradicionalmente, los estudios se han centrado en tratar de demostrar de forma reiterada la existencia de inmunidad cruzada entre el RHDV y el EBHSV, tanto a través de ensayos vacunales en conejos y liebres, como mediante infecciones experimentales en ambas especies (Laurent, 1997). No obstante, la existencia de protección cruzada entre ambos virus no se ha demostrado (Chasey, 1992; Lavazza, 2015) y hoy en día se consideran agentes etiológicos independientes. Los calicivirus no patógenos del conejo, sin embargo, han demostrado su eficacia en la protección frente al RHDV (Capucci, 1998). Sin embargo, el título de anticuerpos existente no siempre es protector frente al virus (Marchandeu, 2005, lo que ha conducido a la elaboración de diferentes hipótesis. La distancia filogenética entre ambos virus (Le Gall-Reculé, 2003) y las diferencias genéticas entre ellos (Strive, 2009), son características que afectan directamente a la inmunidad y que se postulan como clave en la ausencia de protección cruzada. Otros aspectos, como la incapacidad del RCV para evitar la infección por el RHDV (Strive, 2010) o la declinación de anticuerpos dependiente del tiempo post-exposición (Henning, 2005b) también han sido estudiados como posibles causas de la ausencia de protección en estos casos. La aparición del RCV-A1 en Australia constituye un paso más en la comprensión de la inmunidad cruzada entre calicivirus. En este caso, se ha observado que la circulación del virus no patógeno está relacionada con una menor incidencia de RHDV, debido a la producción de una respuesta inmune eficaz que persiste hasta 8 semanas post-exposición (Liu, 2014).

Las diferencias entre aislados virales, en cuanto a producción de inmunidad, se han observado tanto entre calicivirus no patógenos, como patógenos. Existen estudios que demuestran la menor eficacia de las vacunas frente al RHDV cuando se aplican en infecciones con RHDVa (Capucci, 1998; Schirrmeier, 1999; Matiz, 2006;), al igual que la ausencia de

protección cruzada entre RHDV y RHDVb (Abrantes, 2013; Le Gall-Reculé, 2013; Peacock, 2017). Estas observaciones sugieren que las diferencias de tipo genético y antigénico entre las diferentes variantes del virus, son el elemento determinante en el desarrollo de una inmunidad efectiva, sin poder descartarse por ello la interferencia de otros factores. Por estos motivos, resulta interesante la evaluación de la inmunidad producida frente a diferentes aislados virales que, a pesar de inducir cuadros clínicos de curso similar, pueden ser portadores de diferencias antigénicas.

En este estudio, se evaluó la respuesta inmune elaborada en animales vacunados y no vacunados, enfrentados experimentalmente a 4 aislados del RHDVb obtenidos a partir de diferentes brotes ocurridos en España en 2014. Debido a la especial afinidad que presenta este virus hacia los animales jóvenes, los animales seleccionados para este estudio fueron gazapos, especialmente susceptibles a la infección. La vacunación en gazapos muestra una serie de inconvenientes relacionados con su desarrollo inmunológico, fundamentalmente la presencia de inmunidad maternal hasta la edad de 25-28 días y la inmadurez de su sistema inmunitario, que se encuentra en fase de desarrollo durante los primeros meses de vida (Cooke, 2000). En segundo lugar, es necesario tener en cuenta que cualquier procedimiento que implique manejo de animales que se encuentran en el nido, puede causar estrés tanto a las crías como a la madre, por lo que la manipulación debe realizarse de forma calmada y durante el menor tiempo posible. En el caso de gazapos ya destetados, el estrés derivado del manejo también existe, de modo que las actuaciones clínicas deben llevarse a cabo con cautela para evitar las posibles consecuencias derivadas de una situación de estrés sostenido. Los animales incluidos en este estudio, tenían 28 días de edad, por lo que las posibilidades de producirse un bloqueo inmunológico derivado de la presencia de anticuerpos maternos (Tizard, 2009) era mínimo.

La vacuna testada durante este estudio es una vacuna monovalente frente al RHDVb, de primera generación, es decir elaborada a partir de tejido hepático procedente de animales experimentalmente infectados. En esta vacuna el virus se halla inactivado, por lo que las posibilidades de reversión a un estado virulento deberían ser nulas, si el procedimiento se ha llevado a cabo de forma correcta. El adyuvante que incorpora es AlOH, un compuesto de uso común en la elaboración de vacunas. Este producto, no obstante, es responsable de la aparición de reacciones adversas de tipo local como las que se observaron durante el estudio, es decir, la aparición en el punto de inoculación de un nódulo subcutáneo. Este nódulo apareció en todos los animales, a pesar de la correcta aplicación de la vacuna, que se inyectó tras haberla atemperado y homogeneizado, y utilizando en todo caso material estéril. Este

efecto adverso, no obstante, se considera de poca relevancia clínica debido a sus características. Se trata de un nódulo subcutáneo, no encapsulado, de aspecto caseoso y friable, cuyo estudio microscópico no revela la presencia de células y cuyo cultivo es estéril. Se ha determinado que este tipo de formaciones asociadas a la vacunación se eliminan de los tejidos en el plazo aproximado de un mes, por lo que su presencia una vez que los animales llegan a matadero sería residual. En este caso, a pesar de que la duración del estudio no permitió observar la desaparición total del nódulo, se pudo apreciar una disminución de su tamaño y del eritema cutáneo asociado, en la mayor parte de los animales. La infección tuvo lugar el día 7 post-vacunación, ya que las indicaciones del fabricante garantizan la producción de una respuesta inmune eficaz en 7 días.

Puesto que el período experimental tuvo lugar en instalaciones NCB3⁴⁹, la aparición de enfermedad a partir de este momento estaría presumiblemente relacionada con la acción del virus. La realización del estudio en condiciones de bioseguridad 3 presenta múltiples ventajas. En primer lugar, se reducen al máximo las posibilidades de contaminación, garantizando la fiabilidad de los resultados al evitar la interacción de agentes externos sobre los animales. Asimismo, se minimiza el riesgo de diseminación del virus al medio ambiente, lo que resulta especialmente importante en estudios como éste, en los que un agente de gran virulencia está implicado.

Además de realizar el estudio con la bioseguridad necesaria, se controló el adecuado estado de los animales en su entorno. El mantenimiento de unas condiciones ambientales apropiadas para los animales, expuestos a rangos de humedad y temperatura estables y a un número de horas de luz constante, son aspectos que mejoran el bienestar de los animales. Desde este punto de vista, se elaboraron protocolos para el mantenimiento de los animales en las condiciones más apropiadas a su edad y tamaño. Se alojaron en grupos de 4 a 6 animales, en jaulas adaptadas a la legislación vigente, y habilitadas de manera que todos tuvieran acceso permanente a un lugar de refugio, agua, heno y pienso. El manejo se llevó a cabo por profesionales especializados y en todo momento se evitaron las situaciones que pudieran generar estrés (ruido, manejo excesivo, movimiento de las jaulas, cambios de personal). Los animales estaban monitorizados por cámaras de forma permanente, y el personal accedía a las instalaciones dos veces al día para comprobar su estado general, el estado higiénico de las jaulas, comederos y bebederos, y para realizar los ajustes pertinentes. Los procedimientos

⁴⁹ Nivel de Contención Biológica 3

clínicos se llevaron a cabo por personal veterinario, manteniendo las pautas de mínimo manejo y reducción de estrés. La monitorización de los animales durante los 7 días post-infección, se realizó a días alternos con el objetivo de disminuir en lo posible el manejo de los animales. Durante esta etapa, se prestó especial atención a la aparición de signos inespecíficos de enfermedad, tales como fiebre, apatía o diarrea, además de comprobar el estado de salud general y tomar medidas de peso de los animales. La evaluación del punto de inyección vacunal se realizó de forma consistente. En el período post-infección, los animales se monitorizaron a diario, a pesar de suponer un mayor manejo, debido a la rapidez con que cursa la enfermedad. Durante esta etapa, además de los signos inespecíficos, se observaron otros comportamientos en los animales que sugerían un estado sanitario alterado, tales como anorexia, erizamiento del pelo, temblores, apatía y ataxia. La observación de temperaturas superiores a 40°C fue un hallazgo común durante este período. La presencia de signos sugestivos de la enfermedad (postración, fiebre, erizamiento) o la aparición de signos neurológicos (ataxia, vocalizaciones) o que disminuyeran la calidad de vida de los animales, se consideraron motivo de eutanasia humanitaria. No obstante, la presentación más frecuente de la enfermedad produjo como desenlace la muerte súbita de los animales, indicando la elevada virulencia que presentaban los aislados. Los hallazgos de necropsia que se consideraron de especial relevancia clínica, fueron la presencia de hepatomegalia, patrón lobulillar marcado y esplenomegalia (Dalton, 2012; Duarte, 2015), puesto que son signos específicos de infección por el virus. Otros signos como ascitis, edema pulmonar o congestión vascular generalizada, también se tuvieron en cuenta y se observaron en numerosas ocasiones en los animales afectados.

La eficacia vacunal se dedujo de forma presuntiva, mediante las tasas de supervivencia de los animales al desafío, y se determinó mediante el cálculo de la Fracción Prevenible (Tizard, 2009), cuyos resultados ofrecen datos sobre la efectividad de la vacuna. Se considera que resultados iguales o superiores a 0,8 muestran la eficacia de la vacuna frente al patógeno en estudio, y garantizan la idoneidad de la misma para su uso generalizado. En este estudio, la vacunación frente a 2 aislados virales de RHDVb obtuvo valores de FP de 0,86 mientras que frente a los 2 aislados restantes obtuvo FP=1. Las diferencias obtenidas en los valores de FP pueden deberse a varios factores. En primer lugar, es importante considerar la posible influencia de los factores individuales, como el estado inmunitario de los animales o su tamaño, entre otros. En este caso, las observaciones clínicas no mostraron alteraciones en el estado sanitario de los animales durante el estudio. En cuanto al peso de los animales, que se

midió durante todo el período experimental a días alternos, no se observaron diferencias en el peso en el momento de la vacunación ni en la GMD⁵⁰ de los distintos grupos, que se puedan relacionar con los diferentes resultados obtenidos para los aislados 1-4 y 2-3. Por otro lado, además de considerar la influencia de los factores individuales sobre la respuesta vacunal, es necesario tener en cuenta las posibles diferencias entre los aislados. Desde este punto de vista, el menor valor de FP obtenido para los aislados 1-4 podría indicar, bien que la vacuna no presenta características antigénicas idóneas frente a dichos aislados, o bien que la patogenicidad de los mismos es superior a la que presentan los aislados 2-3, observación que justificaría la mayor profusión de signos clínicos observada en los aislados 1-4. Tanto la presencia de diferencias antigénicas entre cepas como las diferencias en la patogenicidad de los aislados han sido descritas en los calicivirus y, en concreto, en el RHDVb se han detectado incrementos en la virulencia desde el momento de su descripción (Capucci, 2017). El estudio genético de estos aislados podría determinar si presentan diferencias que puedan justificar los diferentes resultados obtenidos.

La evaluación global de la vacuna muestra varias características que la hacen adecuada para su uso clínico. En primer lugar, es importante destacar la eficacia vacunal, que se ha demostrado mediante este ensayo clínico, y que es el objetivo fundamental de esta investigación. A pesar de las posibles diferencias existentes entre los 4 aislados virales incluidos, la vacuna confiere niveles de protección adecuados frente a todos ellos. En todos los casos, los valores de FP son superiores al mínimo establecido para la utilización de la vacuna en animales, por lo que se puede afirmar que resulta eficaz frente al virus. En segundo lugar, es necesario destacar la ausencia de efectos adversos relevantes tras la aplicación de esta vacuna en gazapos. El incremento de temperatura post-vacunal fue, en todos los casos, inferior a 1°C y se estabilizó antes de 48 horas. Este incremento de temperatura no presenta relevancia clínica y no interfiere de ninguna manera la actividad normal de los animales, por lo que se puede considerar un efecto adverso poco relevante. En cuanto al efecto directo derivado del adyuvante vacunal, ampliamente descrito en la literatura (Munks, 2010), no provoca daños en el animal y se elimina antes de la llegada de la canal al consumidor, por lo que tampoco se considera un efecto adverso relevante.

En conclusión, la evaluación de esta vacuna frente al RHDVb ha demostrado que resulta eficaz tanto desde el punto de vista inmunológico, como de su bioseguridad. No

⁵⁰ De las siglas: Ganancia Media Diaria

obstante, es recomendable la realización de estudios complementarios sobre la respuesta inmune que produce, la posibilidad de transmisión vertical, así como la duración de la inmunidad y el efecto de la revacunación, con el objetivo de establecer un calendario vacunal adaptado al producto. Este estudio garantiza la posibilidad de inmunizar animales recién destetados y carentes de inmunidad maternal, en la etapa vital en que muestran mayor susceptibilidad al RHDVb. La vacunación a edades tan tempranas como los 25-28 días, permite reducir la ventana de desprotección existente entre el declive de los anticuerpos maternos y la primovacunación, incrementando las posibilidades de éxito en la lucha contra el RHDVb.

2. Valoración de la Respuesta Inmune en gazapos frente a un aislado del RHDVb

La interacción entre el agente etiológico y la Respuesta Inmune del hospedador es uno de los elementos clave en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Además del uso de fármacos dirigidos a paliar los signos clínicos derivados de la acción vírica del patógeno sobre los tejidos, es necesaria la participación del organismo en la eliminación del agente infeccioso. En este estudio, nuestro objetivo fue evaluar el tipo de respuesta que se producía frente a la infección experimental con el RHDVb en animales vacunados y no vacunados, con el propósito de detectar posibles diferencias y analizar sus consecuencias sobre el desarrollo de la enfermedad. Se ha determinado que la respuesta a la infección por el RHDV en animales resistentes y susceptibles presenta diferencias tanto a nivel sanguíneo como a nivel de los infiltrados inflamatorios orgánicos. Puesto que el RHDVb presenta gran cantidad de similitudes con el RHDV, se consideró la hipótesis de que las diferencias en el tipo de respuesta inmune producida por los animales pudiera estar implicada en el desarrollo de la enfermedad y su desenlace.

Los animales seleccionados para este estudio fueron hembras de 28 días, que se dividieron en 3 grupos denominados *control* (infección viral), *desafío* (infección viral, previa vacunación) y *vacunal* (vacunación). La vacunación se aplicó el día 0 en los grupos *desafío* y *vacunal*, y la infección se llevó a cabo el día 7 en los grupos *desafío* y *control*. La vacuna utilizada, el tipo de inóculo viral y las condiciones ambientales y de manejo aplicadas en el estudio, fueron las mismas que se han explicado en el apartado anterior. Al final del período

experimental se realizó la necropsia de todos los animales con objetivos diagnósticos y de toma de muestras. Se realizó un test de tipo inmunocolorimétrico *in situ* y el diagnóstico laboratorial se llevó a cabo mediante el método recomendado, ELISA-DAS⁵¹ (MAPAMA, 2014). Los animales pertenecientes al grupo *vacunal* no mostraron signos clínicos o lesiones indicativos de infección y el análisis de necropsia fue consistente con estas observaciones. Tanto el test rápido como el ELISA-DAS, que se realizó a modo de control, revelaron resultados negativos en estos animales, como se esperaba. Los animales pertenecientes al grupo *desafío* mostraron signos clínicos inespecíficos durante el período experimental (incrementos esporádicos de temperatura, alteraciones respiratorias, congestión conjuntival) y en la necropsia se observaron lesiones que podrían sugerir infección por el virus, en algunos animales (descoloración hepática, petequias). El test colorimétrico ofreció resultados variables en este grupo y se obtuvieron resultados positivos en el ELISA, aunque muy cercanos al punto de corte establecido. Los animales incluidos en el grupo *control* mostraron síntomas significativos de la enfermedad y murieron antes de la finalización del período experimental. Los hallazgos de necropsia fueron concluyentes con el diagnóstico presuntivo y tanto el test *in situ* como el ELISA mostraron resultados positivos, éste último, ofreciendo valores más alejados del punto de corte que en el caso anterior.

La evaluación de estos resultados muestra cómo dos grupos de animales infectados con el mismo inóculo viral, *desafío* y *control*, reaccionan de forma diferente frente al agente patógeno, presumiblemente debido a la presencia de anticuerpos específicos producidos tras la vacunación en los animales del grupo *desafío*. No obstante, en este grupo los resultados del test *in situ* muestran resultados positivos en algunos animales, mientras que son negativos en otros, probablemente debido a la presencia en estos últimos de un título inferior al límite de detección del test. Estos resultados sugieren que la cantidad de virus presente en cada animal y, probablemente la replicación, varía dependiendo de factores individuales, puesto que tanto la dosis vacunal como el título del inóculo viral son factores controlados. Considerando que todos los animales tienen la misma edad y pesos medios similares, y que su estado de salud es homogéneo, como se comprobó durante la cuarentena, parece probable que las diferencias en el título viral entre los animales se deban a diferencias en la intervención del sistema inmune. Por otro lado, el caso del grupo *control*, mostró resultados más homogéneos y un mayor título viral en los tejidos respecto al grupo *desafío*, como muestran los valores obtenidos en el ELISA. La mayor severidad de los signos clínicos y las lesiones observadas en estos

⁵¹ ELISA de doble captura de anticuerpo

animales, así como la presencia de valores más elevados en el ELISA diagnóstico, indican que en estos animales la replicación viral y la diseminación orgánica del virus tuvieron lugar en mayor medida que en el grupo *desafío*, que a pesar de estar infectado y presentar ciertas lesiones orgánicas, fue capaz de sobrevivir a la infección. Estos resultados muestran la importancia de la aplicación de vacunas en la prevención de la enfermedad, ya que, a pesar de observarse signos clínicos y determinarse la presencia del virus en los tejidos, los animales previamente vacunados son capaces de evitar el desarrollo de un cuadro clínico asociado a la infección.

Debido a la rapidez con que se resuelve la enfermedad (OIE, 2015; Trzeciak, 2015), la evaluación de la respuesta inmune en las primeras fases tras la infección es fundamental (Tisoncik, 2012; Tizard, 2009). Por este motivo, analizamos los niveles de IFN γ y el título de anticuerpos de los animales durante todo el período experimental, con el objetivo de evaluar la reacción producida frente a la vacunación y la infección. El título de anticuerpos se evaluó mediante IHA, mientras que los niveles de IFN γ se midieron utilizando una técnica ELISA comercial. El título de anticuerpos de todos los animales mostraba niveles correspondientes con títulos protectores basales, lo que podría suponer la presencia residual de inmunidad maternal. No obstante, puesto que este tipo de inmunidad declina a partir de una edad aproximada de 25 días y los niveles observados se hallaban en torno a valores basales, se consideró que la persistencia de los mismos sería de breve duración y su efecto no interferiría de forma significativa con la vacunación de los animales, aunque se tuvo en cuenta su posible efecto bloqueante. Los grupos *desafío* y *vacunal* desarrollaron un título protector de anticuerpos alejado del nivel basal durante los 7 días post-vacunación, que continuaron incrementándose hasta el final del período experimental. Estos grupos mostraron ligeras diferencias en el desarrollo de anticuerpos, observándose un ligero retraso en el grupo *desafío* respecto del grupo *vacunal*, a pesar de incrementar sus títulos a un ritmo homogéneo. Este desfase se debe probablemente a la acción de la infección viral sobre el organismo en el grupo *desafío*, ya que podría interferir frenando momentáneamente la capacidad de respuesta del animal, que se incrementa de nuevo horas después. La observación de una reacción limitante de este tipo en animales cuyo estado sanitario era bueno y cuya exposición al antígeno se realizaba por segunda vez, es indicativa del efecto irreversible que podría tener la infección en el caso de animales cuyo sistema inmunitario se encuentre comprometido y sea incapaz de reaccionar a la presencia del virus. Sin embargo, los resultados más llamativos son los obtenidos en el grupo *control*. Estos animales incrementaron su nivel de anticuerpos de forma

rápida tras la infección, alcanzando el mismo título que presentaban los animales del grupo *vacunal*, y superiores a los obtenidos por el grupo *desafío*. No obstante, todos los animales del grupo *control* murieron en menos de 5 días tras la infección a pesar de presentar niveles protectores de anticuerpos específicos. Estos resultados sugieren que, además de la presencia de anticuerpos protectores, debe haber algún otro elemento determinante en la supervivencia a la infección, ya que como se deduce de los resultados del análisis ELISA y los hallazgos de necropsia, la presencia de anticuerpos no garantiza el éxito en la lucha contra el virus.

La implicación de las CK en la respuesta inmune es un elemento de gran importancia y cuyo papel en la patogenia del RHDVb aun no se ha descrito completamente (Trzeciak, 2016). Por este motivo, evaluamos los niveles de IFN γ sérico durante todo el período experimental. En el caso del grupo *vacunal*, los niveles de IFN γ se incrementaron tras la vacunación y disminuyeron a partir de las 96 horas post-vacunación. El grupo *desafío* mostró un ligero incremento durante los 7 días post-vacunación, y experimentó un mayor aumento en el título de IFN γ tras la infección. El grupo *control* mantuvo niveles estables hasta la infección, tras la cual experimentó un abrupto incremento en el nivel de IFN γ hasta las 96 horas post-infección, en que se pudieron tomar las últimas muestras. Los valores observados en el grupo *control* 96 horas post-infección casi triplicaban los que mostraba el grupo *desafío* en el mismo momento. A pesar de que las CK son elementos fundamentales en el desarrollo de una adecuada respuesta inmune, su liberación de forma incontrolada puede producir graves daños debido a su toxicidad (Schroder, 2004; Liu, 2016). Además del desarrollo de fiebre y daño tisular que puede conducir a la muerte, se ha determinado que el efecto tóxico de las CK podría ser tan lesivo a nivel hepático como la replicación viral (Aguas, 2014). En el caso concreto del IFN γ , se ha determinado que el incremento abrupto en sus niveles es un signo indicativo de la severidad del proceso en diversas patologías humanas (Bozza, 2008; Sun, 2012; Teijaro, 2014; Liu, 2017), de lo que se podría deducir un funcionamiento similar en animales. En este estudio se observa cómo la liberación masiva de CK, en concreto IFN γ , está directamente relacionada con una mayor mortalidad en los animales, independientemente de su título de anticuerpos frente al virus. Por el contrario, incrementos paulatinos en los niveles de IFN γ se correlacionan con una mayor supervivencia, aun en presencia de lesiones hepáticas y replicación viral, como ocurre en el grupo *control*. Nuestros resultados sugieren que la supervivencia de los animales a la infección no está ligada exclusivamente a la existencia de anticuerpos protectores, sino a la correcta modulación de la respuesta inmune, con un papel preponderante de las CK en el desarrollo de un cuadro clínico fulminante.

Futuros estudios dirigidos a determinar la influencia directa de estas CK sobre el desenlace de la enfermedad, así como su posible modulación experimental, serían de gran interés para el desarrollo de herramientas terapéuticas frente a la RHD.

3. Hallazgos anatomopatológicos en animales expuestos de forma experimental al RHDVb

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo es un calicivirus, por lo tanto, la aparición de variaciones durante su evolución es esperable (Alda, 2010). La primera variante antigénica del virus, RHDVa, y el nuevo virus RHDVb son los hallazgos más importantes debido a su capacidad patogénica, así como a las diferencias antigénicas con el virus original, con el que no presentan protección cruzada. En el caso de los RCV, se han descrito múltiples aislados que muestran diferentes grados de protección cruzada frente a los virus patógenos, así como grados de patogenicidad que varían desde las no patógenas a las moderadamente patógenas. Esta imagen muestra un abanico de virus muy relacionados entre sí y con ligeras a radicales diferencias en su comportamiento. En la actualidad, el virus circulante de más interés es el RHDVb, debido a su reciente aparición y la gravedad con que infecta a los animales. El hecho de que este virus esté mostrando superiores tasas de mortalidad en un período de tiempo muy breve tras su descripción, indica que su capacidad de variación podría ser mayor al del resto de virus descritos anteriormente. Por este motivo, en este estudio se comparan los efectos de 4 aislados del RHDVb obtenidos en diferentes puntos de España, en el mismo período de tiempo, con el objetivo de determinar si existen diferencias en su comportamiento clínico o en las lesiones que producen, que puedan indicar que se trata de variantes diferenciales. En este estudio, se seleccionaron 16 gazapos y se distribuyeron en 4 grupos, uno por cada aislado viral, y cada grupo formado por 4 animales. Con el objetivo de obtener resultados homogéneos con el estudio anterior, se mantuvieron las mismas condiciones experimentales.

Tras la infección de los animales se observó una menor ganancia media diaria, lo que indica la presencia de anorexia en los animales, correspondiendo con la apatía inducida por la infección. La aparición de fiebre pocas horas tras la infección contribuye a la anorexia en los animales. Se observó una resolución muy rápida de la infección en todos los grupos, si bien en los grupos 1 y 4 el tiempo fue inferior a 48 horas, mientras que en los grupos 2 y 3 fue

superior a 72 horas. Esta observación es interesante, ya que se ha relacionado un curso más rápido de la infección con mayores tasas de mortalidad. Es posible que los animales que presentan un curso clínico más largo puedan, durante este tiempo, desarrollar una respuesta frente a la infección capaz de compensar las lesiones producidas. No obstante, esta hipótesis aun no está demostrada y, es muy probable que la confluencia de múltiples factores sea responsable de las tasas de mortalidad observadas. Sin embargo, en lo que respecta a nuestro estudio, se observó una clara diferencia entre los grupos 1-4 y 2-3, en términos de rapidez y severidad de los signos clínicos, que podría indicar diferentes grados de patogenicidad entre los aislados. Estos resultados se corresponden con las observaciones post-mortem de los animales, que muestran una mayor frecuencia de aparición de opistótonos y epistaxis en los animales pertenecientes a los grupos 1-4. La aparición de opistótonos sugiere la presencia de otros signos neurológicos en los animales, por lo que se considera indicativo de gravedad. En cuanto a la epistaxis, se observó un sangrado nasal profuso en los animales de estos grupos, mientras que su presencia en otros grupos fue de tipo espumoso, debido probablemente al edema de pulmón, o sero-sanguinolento. Considerando que la epistaxis es un signo casi patognomónico de la infección, su aparición intensa en los grupos 1 y 4 sugiere la mayor gravedad de la infección en estos animales.

Los hallazgos de necropsia fueron similares en todos los grupos, si bien la severidad de las lesiones mostraba diferencias entre ellos. Los hallazgos histológicos muestran lesiones severas a nivel del hígado y el riñón, órganos esenciales en la eliminación de productos tóxicos del organismo. La pérdida de factores de coagulación por parte del hígado predispone a la producción de CID, con las consecuentes hemorragias y microtrombos observados en estos animales. La toxicidad de los productos de excreción cuando su nivel en sangre aumenta, además de la hipoglucemia provocada por la anorexia y la necrosis hepática, contribuyen a la aparición de signos neurológicos y a la letalidad del cuadro clínico. En el caso de los animales pertenecientes a los grupos 1 y 4, se observa una mayor frecuencia de hemorragias y congestión a nivel del pulmón, lo que provocaría graves dificultades respiratorias en los animales. Como conclusión, los hallazgos macroscópicos e histológicos sugieren que los aislados 1 y 4 producen lesiones más severas en los animales, en un período de tiempo menor. Considerando que la virulencia se define cuantitativamente en relación a la mortalidad y el tiempo de desarrollo de la enfermedad, se podría decir que los aislados 1 y 4 muestran un mayor grado de virulencia que el 2 y 3. Sería interesante caracterizar los 4

aislados para determinar si esta observación puede basarse en diferencias a nivel genético entre los mismos.

4. Posibilidades de tratamiento de la enfermedad. Viabilidad de las opciones terapéuticas actuales

La importancia de la RHD en las poblaciones, tanto silvestres como domésticas, ha provocado que la investigación sobre el virus sea incesante. Sin embargo, existen dos cuestiones sobre la enfermedad que se deberían abordar en un futuro próximo. En primer lugar, resulta frustrante observar el progreso de una enfermedad rápida y agresiva, frente a la que no existen medidas de control diferentes a las que existían hace 3 décadas. A pesar del progreso de la medicina, aun no se han hallado las herramientas necesarias para frenar el desarrollo de la enfermedad una vez instaurada. Probablemente, parte de este problema sea la escasa comprensión que existe sobre los mecanismos patogénicos del virus, más allá del fallo hepático que producen (Trzeciak, 2015). No obstante, la posibilidad de contemplar nuevas hipótesis, como la intervención de las citoquinas en el progreso de la enfermedad, podría ser de gran interés, puesto que parte de la gravedad de la enfermedad radica en la velocidad con que progresa, y que inhabilita la capacidad de respuesta del animal (Trzeciak, 2016). Se ha observado que, en ocasiones, los animales que permanecen en estado letárgico durante unos días, son capaces de recuperarse de la enfermedad (Strive, 2010), por lo tanto, no parece descabellado inducir un estado similar de manera farmacológica, con el objetivo de reducir el gasto energético del animal durante el tiempo en que éste es máximo debido a la infección. Por otro lado, se ha determinado que existe una producción paralela de citoquinas que podrían compensar el efecto lesivo de sus antagonistas; sin embargo, los niveles alcanzados no son suficientes para equilibrar la liberación masiva que resultaría peligrosa (Trzeciak, 2016). Este hecho sugiere la posibilidad de que la aplicación de moléculas farmacológicas de tipo inmunomodulador pudiera tener repercusiones positivas sobre el desarrollo de la enfermedad, al compensar la producción abrupta de citoquinas y anular sus efectos.

El desarrollo de un tratamiento terapéutico frente a la enfermedad es un proceso lento, que no presenta demasiado interés desde el punto de vista ecológico ni de explotación. El principal impedimento para la implantación de un protocolo terapéutico a estos niveles sería de tipo logístico, en el primer caso, y económico en el segundo. Sin embargo, desde el punto

de vista del animal de compañía, el desarrollo experimental de un protocolo clínico podría tener interés, especialmente en regiones como Australia, Nueva Zelanda o el Reino Unido, donde los conejos de compañía se encuentran seriamente amenazados por la enfermedad (Donnolly, 2013; Rocchi, 2016). En estos casos, además de la modulación de la inmunidad y la inducción de la sedación en el animal, resultaría imprescindible la aplicación de fluidoterapia con cristaloides o expansores plasmáticos, para compensar la CID. La transfusión de plasma, plaquetas y fibrinógeno sería una medida terapéutica complementaria que podría mejorar la situación hemodinámica (Páramo, 2006). Asimismo, es necesario controlar la hipotermia en estos animales, cuyo estado hipoglucémico es severo, por lo que también deberá compensarse y mantenerse estable, mediante la realización frecuente de analíticas sanguíneas. Éstas ofrecerán además datos relevantes sobre la situación hepática y renal, mediante la medición de las transaminasas, BUN y creatinina. Frente a la aparición de convulsiones, sería conveniente la aplicación de fármacos anticonvulsivos para evitar lesiones posteriores, si bien la sedación inducida podría compensar estos efectos neurológicos. A pesar de la aplicación de todas las medidas posibles, la patogenia de la enfermedad aun muestra incógnitas, y su desarrollo parece depender de múltiples factores, por lo que no existen garantías de que un tratamiento conservador sea totalmente efectivo frente a la enfermedad (Donnolly, 2013). Como profesionales clínicos, este hecho debe mostrarse de forma clara y directa al propietario del animal, antes de la aplicación de cualquier tratamiento experimental.

Sin embargo, existen una serie de terapias que han mostrado su eficacia de manera experimental frente al RHDV. En primer lugar, la aplicación de n-acetil-cisteína se ha testado debido a sus efectos anti-apoptóticos (Trzeciak, 2015), sugiriendo una ralentización de las lesiones celulares causadas por el virus, que incrementaría el tiempo que tiene el organismo para reaccionar frente al daño celular. En segundo lugar, se han realizado ensayos con cardiotrofina y se han obtenido resultados positivos. Esta molécula es una CK capaz de activar vías de supervivencia celular mediante una reducción de los mecanismos de apoptosis. Su acción reduce el estrés oxidativo de las células y la inflamación, protegiendo el tejido hepático de las lesiones principales derivadas de la infección por el RHDV (Tuñón, 2011a,b)

Por otro lado, es interesante destacar el papel de la melatonina en la protección hepática. Esta molécula interviene en el sistema denominado neuro-inmuno-endocrino y posee acción antiinflamatoria (Laliena, 2012), mediante la inhibición de la esfingosina-1-P, una CK inflamatoria que incrementa su actividad debido a la infección por el RHDV (Crespo, 2016). Además de su capacidad antiinflamatoria, la melatonina es un potente antioxidante

(Crespo, 2010; Laliena, 2012) y disminuye el estrés celular retículo-endotelial (San Miguel, 2014). Mediante la inhibición de la expresión de proteínas transmembrana y nucleares, minimiza el daño hepático y, de manera simultánea, incrementa la producción de factores de crecimiento y sus receptores con el objetivo de regenerar el tejido dañado (Laliena, 2012). La autofagia inducida por el virus, así como los mecanismos de apoptosis, son inhibidos por la melatonina que, además, inhibe la replicación viral (San Miguel, 2014). Finalmente, se ha descrito que esta molécula es capaz de inhibir la producción de transaminasas (ALT, AST, LDH), así como de actuar sobre la hipoglucemia (Crespo, 2010), dos de las alteraciones que aparecen en los animales afectados por el RHDV, por lo que se postula como un elemento clave en el tratamiento del fallo hepático fulminante (San Miguel, 2014; Crespo, 2016).

Una posibilidad en estudio es el tratamiento de la enfermedad mediante la aplicación de moléculas antivirales. Este tipo de fármacos funcionan mediante interferencia con diferentes fases del ciclo viral (unión celular, internalización, liberación del genoma, transcripción) interrumpiendo la producción de viriones (Rohayem, 2010). A pesar de la existencia de moléculas protectoras, tratamientos conservadores y fármacos potencialmente eficaces, en la actualidad, ninguno de estos métodos se encuentra disponible para su uso clínico. La aplicación de cualquier tipo de tratamiento paliativo sobre conejos de compañía es, prácticamente, empírico y sus resultados son impredecibles, mientras que, a nivel de explotación, la aplicación de cualquier tipo de terapia distinta de la vacunación de emergencia es, hoy en día, inviable. **5**

5. Importancia de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo como modelo de estudio en medicina humana

La enfermedad hemorrágica del conejo se utiliza como modelo de estudio del fallo hepático fulminante, tanto de origen infeccioso como derivado del uso de drogas en humanos (Abrantes, 2012; Laliena, 2012). Estas enfermedades presentan importantes similitudes clínicas, por lo que los resultados obtenidos en estudios sobre RHD pueden extrapolarse a los casos de FHF⁵², en la mayor parte de casos (Tuñón, 2003). Algunos de los signos clínicos que concurren en ambas patologías son el aumento de transaminasas y bilirrubina derivado de las graves lesiones en el tejido hepático. Estas lesiones provocan además alteraciones en el perfil

⁵² Fallo Hepático Fulminante

de aminoácidos, hipoglucemia y pérdida de factores de coagulación. La CID que acompaña a la hepatopatía provoca la aparición de microtrombos y hemorragias, y se considera una de las causas que contribuyen a la mortalidad, si bien ambas patologías deben diagnosticarse de forma diferencial (Páramo, 2006). La situación de hipoglucemia que se genera debido a la incapacidad gluconeogénica y a la pérdida de insulina, participa en la aparición de signos neurológicos, junto con la circulación de toxinas potenciales como el BUN y la creatinina. Estos signos nerviosos, que en ocasiones se acompañan de edema cerebral e hipertensión craneal, conducen al coma y la muerte cerebral, provocando en algunas ocasiones herniación craneal, que provoca la muerte de forma inminente (Tuñón, 2003).

El fallo hepático que se desarrolla como resultado de la infección viral es el signo clínico más evidente de ambas enfermedades. Se ha determinado que la situación de equilibrio que existe entre proliferación celular y apoptosis depende de la efectividad del sistema inmune frente al ROS⁵³, causante del estrés oxidativo celular. Este elemento lesiona las mitocondrias, activa el NF-κB⁵⁴, de efecto proinflamatorio, y activa la apoptosis (Sánchez-Campos, 2004), que se regula tanto por la vía intrínseca como extrínseca. La vía intrínseca se activa por el estrés oxidativo, que permite la liberación de proteínas mitocondriales mediante la inducción de cambios en la permeabilidad de la membrana, lo que activa, como resultado, la ruta de las caspasas. La vía extrínseca, activa las caspasas mediante la acción directa sobre receptores de membrana. En ambos casos, el resultado es un incremento de la apoptosis que lesiona los hepatocitos y las células endoteliales (Tuñón, 2011; Vallejo, 2014).

La actividad regenerativa del hígado podría compensar estos daños, como se ha observado en animales jóvenes, resistentes de forma natural al RHDV (Marques, 2012) aunque se ha determinado que los factores de crecimiento no participan en la activación de la regeneración celular durante la infección por el RHDV (Sánchez-Campos, 2004). Sin embargo, moléculas como la cardiotrofina-1, que induce la expresión de moléculas anti-apoptóticas, la N-acetil-cisteína, que inhibe el estrés oxidativo, y la melatonina, que antagoniza las vías intrínseca y extrínseca de regulación de la apoptosis, resultan efectivas en la reversión de las lesiones hepáticas o el mantenimiento de su estabilidad (Tuñón, 2011, Laliena, 2012), ralentizando la progresión de la enfermedad en el paciente mientras llega el momento de recibir un trasplante.

⁵³ De sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*

⁵⁴ De sus siglas en inglés: *Nuclear Factor κB*

La utilización de VLPs como vectores de antígenos para su uso como vacuna, se ha realizado de forma experimental en ratones y porcino (Hung, 2000; Gil, 2006; Farnós, 2006; Crisci, 2012; Chen, 2014; Yang, 2015), tanto para determinar sus propiedades inmunogénicas, como para evaluar su potencial como vector de antígenos heterólogos. La aplicación de VLPs derivadas del RHDV como vectores vacunales o antitumorales (Esteves, 2008) en otras especies, incluyendo la humana (Peacey, 2007), se ha postulado como una opción futura de bajo coste, que presumiblemente resultaría efectiva. Estas investigaciones ofrecen posibilidades terapéuticas prometedoras, por lo que en el futuro esperamos poder controlar la enfermedad vírica hemorrágica, no sólo mediante la aplicación de medidas preventivas, sino a través de un tratamiento médico eficaz.

IX. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas del trabajo de investigación realizado en esta Tesis Doctoral, son las siguientes:

Primera: La vacuna testada frente a la nueva variante de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo resultó eficaz en la protección de los animales frente a los 4 aislados virales utilizados en el desafío, alcanzando valores de FP superiores a 0,8 en todos los casos estudiados. Los valores de FP obtenidos frente a los 4 aislados virales, muestran que la vacuna estudiada es válida para proteger a los animales frente a diferentes cepas del RHDVb y es apta para su uso generalizado y su comercialización.

Segunda: Los animales vacunados y expuestos por la vía natural al RHDVb, mediante contacto directo con animales infectados experimentalmente, no desarrollaron síntomas de enfermedad ni se observaron hallazgos de necropsia indicativos de infección por el virus. Los animales vacunados y posteriormente infectados de forma experimental con el RHDVb, no desarrollaron la enfermedad y mostraron lesiones orgánicas de tipo leve.

Tercera: El uso de la vacuna en conejos menores de 30 días no produjo alteraciones en el comportamiento normal de los animales, su nivel de ingesta o su actividad. La aplicación del producto vacunal en los gazapos, mediante una sola inyección por vía subcutánea, no produjo efectos adversos de relevancia.

Cuarta: Los resultados obtenidos a partir de la prueba ELISA-DAS mostraron que los animales vacunados e infectados de manera experimental, alcanzaban títulos virales similares a los existentes en los animales vacunados y expuestos de forma natural al virus. En ninguno de estos casos se produjo enfermedad.

Quinta: Los análisis de HA mostraron que los niveles de anticuerpos específicos en los animales vacunados, alcanzaron títulos protectores en menos de 7 días. El título de anticuerpos de estos animales se incrementó tras la exposición al virus, ya fuera por vía

natural o mediante infección experimental. En los animales no vacunados, los análisis de HA mostraron el desarrollo de títulos de anticuerpos protectores, de forma simultánea al progreso de un cuadro clínico letal.

Sexta: Los resultados obtenidos en el análisis ELISA-IFN γ mostraron un incremento moderado en el título de IFN γ en los animales vacunados, tras la aplicación de la vacuna. Estos niveles se incrementaron tras la infección experimental de los animales. En los animales no vacunados, se observó un incremento abrupto en el título de IFN γ tras la infección experimental.

Séptima: El análisis de los resultados obtenidos a partir de las pruebas de HA y ELISA-IFN γ indican que el desarrollo de anticuerpos específicos es necesario para la evasión de la enfermedad. No obstante, estos resultados sugieren que un incremento rápido en el nivel de citoquinas podría estar relacionado con el desenlace letal de la enfermedad.

Octava: Los aislados de RHDVb utilizados en esta investigación mostraron diferencias en su patogenicidad desde el punto de vista clínico y anatomopatológico. Los aislados 1 y 4 produjeron un cuadro clínico de curso rápido (24-48h) y los animales mostraron de forma consistente los signos característicos de la enfermedad (epistaxis, opistótonos). Las lesiones macroscópicas e histológicas observadas en estos animales mostraron gran intensidad. Por el contrario, los aislados 2 y 3 produjeron un cuadro clínico de curso más lento (48-96h) con presencia esporádica de signos típicos de la enfermedad y lesiones macroscópicas e histológicas de menor intensidad que en los grupos anteriores. Estos resultados demuestran la co-existencia de cepas de RHDVb con diferentes grados de patogenicidad, que circulan de forma simultánea en las poblaciones.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abrantes J, Esteves PJ, van der Loo W. *Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. Arch Virol 153 (2): 329-35 (2008) doi: 10.1007/s00705-007-1084-0.

Abrantes J, Esteves PJ. *Not-So-Novel Michigan Rabbit Calicivirus*. Emerging Infectious Diseases Vol. 16, No. 8 (2010)

Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review*. Vet Res 10; 43: 12 (2012) doi: 10.1186/1297-9716-43-12

Abrantes J, Lopes AM, Esteves PJ. *Complete genomic sequences of rabbit hemorrhagic disease virus G1 strains isolated in the European rabbit original range*. J Virol 86 (24): 13886 (2012) doi: 10.1128/JVI.02683-12

Abrantes J, Lopes AM, Dalton KP, Melo P, Correia JJ, Ramada M, Alves PC, Parra F, Esteves PJ. *New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013*. Emerg Infect Dis 19 (11): 1900-2 (2013) doi: 10.3201/eid1911.130908

Abrantes J, Lopes AM, Dalton KP, Parra F, Esteves PJ. *Detection of RHDVa on the Iberian Peninsula: isolation of an RHDVa strain from a Spanish rabbitry*. Arch Virol 159 (2): 321-6 (2014) doi: 10.1007/s00705-013-1808-2

Abu Elzein EM, Al-Afaleq AI. *Rabbit haemorrhagic disease in Saudi Arabia*. Vet Rec 144 (17): 480-1 (1999)

Aguas AP, Marques RM, Teixeira L, Oliveira MJ, Costa-e-Silva A, Ferreira PG, *Rabbit haemorrhagic disease: cytokine storm and bystander apoptosis in the liver of infected adult rabbits*, 6th ISCAA CONGRESS Rev. Arg. Anat. Clin. 6 (2): 99-135 (2014)

Alda F, Gaitero T, Alcaraz L, Zardoya R, Doadrio I, Suárez M. *Coevolución de los virus de la mixomatosis y de la enfermedad hemorrágica del conejo (Oryctolagus cuniculus L. 1758) en la Península Ibérica*. Proyectos de investigación en parques nacionales: 2003-2006 (2008)

Alda F, Gaitero T, Suárez M, Doadrio I. *Molecular characterisation and recent evolution of myxoma virus in Spain*. Arch Virol 154: 1659–1670 (2009)

Alda F, Gaitero T, Suárez M, Merchán T, Rocha G, Doadrio I. *Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe*. BMC Evol Biol 10: 347 (2010) doi:10.1186/1471-2148-10-347

Alexandrov M, Peshev R, Yanchev I, Bozhkov S, Doumanova L, Dimitrov T, Zacharieva S. *Immunohistochemical localization of the rabbit haemorrhagic disease viral antigen*. Arch Virol 127 (1-4): 355-63 (1992)

Alexandrov M, Peshev R, Bozhkov S, Yanchev I, Doumanova L. *Electron- and immunoelectron-microscopic investigation on the rabbit haemorrhagic disease virus*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 16 (1): 21-7 (1993)

Almanza, H. Tesis Doctoral *Análisis de las bases moleculares del tropismo del calicivirus felino*. Facultad CC. Biológicas UCM (2011)

Almeida T, Lopes AM, Magalhães MJ, Neves F, Pinheiro A, Gonçalves D, Leitão M, Esteves PJ, Abrantes J. *Tracking the evolution of the G1/RHDVb recombinant strains introduced from*

the Iberian Peninsula to the Azores islands, Portugal. Infect Genet Evol 34: 307-13 (2015) doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.010

Alonso C, Oviedo JM, Martín-Alonso JM, Díaz E, Boga JA, Parra F. *Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease*. Arch Virol 143 (2): 321-32 (1998)

Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. *Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses*. The Journal of Infectious Diseases 181 (2): S336–48 (2000)

Angermann R. *Overview of the lagomorphs. Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation plan*. IUCN/SSC (1990)

Aragónés I, Brana A, Martín P. *Estudio de los síntomas de la enteropatía mucoide en gazapos en crecimiento*. Boletín de cunicultura 156 (2008)

Argüello JL. *Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response*. Rev Sci Tech 10 (2): 459-80 (1991)

Asgari S, Hardy JR, Sinclair RG, Cooke BD. *Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia*. Virus Res 54 (2): 123-32 (1998)

Asgari S, Hardy JR, Cooke BD. *Sequence analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia: alterations after its release*. Arch Virol 144 (1): 135-45 (1999)

Bárcena J, Morales M, Vázquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, Pagès-Manté A, Sánchez-Vizcaíno JM, Blasco R, Torres JM. *Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus*. J Virol 74 (3): 1114-23 (2000)

Bárcena J, Guerra B, Angulo I, González J, Valcárcel F, Mata CP, Castón JR, Blanco E, Alejo A. *Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles*. Vet Res 24; 46: 106 (2015) doi: 10.1186/s13567-015-0245-5

Baily JL, Dagleish MP, Graham M, Maley M, Rocchi MS. *RHDV variant 2 presence detected in Scotland*. Vet Rec 19; 174 (16): 411 (2014) doi: 10.1136/vr.g2781

Bergin IL, Wise AG, Bolin SR, Mullaney TP, Kiupel M, Maes RK. *Novel Calicivirus Identified in Rabbits, Michigan, USA*. Emerging Infectious Diseases 15 (12) (2009) DOI: 10.3201/eid1512.090839

Berninger ML, House C. *Serologic comparison of four isolates of rabbit hemorrhagic disease virus*. Vet Microbiol 47 (1-2): 157-65 (1995)

Bertagnoli S, Gelfi J, Petit F, Vautherot JF, Rasschaert D, Laurent S, Le Gall G, Boilletot E, Chantal J, Boucraut-Baralon C. *Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus*. Vaccine 14 (6): 506-10 (1996)

Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, Boilletot E, Vautherot JF, Rasschaert D, Laurent S, Petit F, Boucraut-Baralon C, Milon A. *Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein*. J Virol 70 (8): 5061-6 (1996)

- Best SM, Kerr PJ.** *Coevolution of Host and Virus: The Pathogenesis of Virulent and Attenuated Strains of Myxoma Virus in Resistant and Susceptible European Rabbits.* Virology 267, 36-48 (2000) doi:10.1006/viro.1999.0104
- Biermann U, Herbst W, Baljer G.** *Rabbit hemorrhagic disease (RHD) comparative diagnostic studies using the hemagglutination test and electron microscopy.* BerlMunch Tierarztl Wochenschr 105 (3): 86-7 (1992)
- Boga JA, Marín MS, Casais R, Prieto M, Parra F.** *In vitro translation of a subgenomic mRNA from purified virions of the Spanish field isolate AST/89 of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV).* Virus Res 26 (1): 33-40 (1992)
- Boga JA, Casais R, Marin MS, Martin-Alonso JM, Carmenes RS, Prieto M, Parra F.** *Molecular cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89).* J Gen Virol 75 (9): 2409-13 (1994)
- Boga JA, Martín Alonso JM, Casais R, Parra F.A.** *Single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in Saccharomyces cerevisiae induces protection.* J Gen Virol 78 (9): 2315-8 (1997)
- Boniotti B, Wirblich C, Sibilia M, Meyers G, Thiel HJ, Rossi C.** *Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus.* J Virol 68 (10): 6487-95 (1994)
- Boucher S, Rubeaux D, Le Gall-Reculé G, Rigaudeau A.** *Cartographie des cas de VHD à RHDV2 (virus variant 2010) à partir des virus isolés depuis 2010 de lapins domestiques en France métropolitaine, sur l'île de la Réunion et en Espagne à l'aide d'une technique de RT-PCR temps réel.* 16èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France (2015)
- Bouslama A, De Mia GM, Hammami S, Aouina T, Soussi H, Frescura T.** *Identification of the virus of rabbit haemorrhagic disease in Tunisia.* Vet Rec 138 (5): 108-10 (1996)
- Bozza A, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF.** *IFN-gamma as predictive factors for severity.* BMC Infect. Dis 8: 86 (2008) doi: 10.1186/1471-2334-8-86
- Branco, M, Ferrand, N, Monnerot, M.** *Phylogeography of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene.* Heredity 85: 307–317 (2000)
- Branco, M, Monnerot, M, Ferrand, N, Templeton A.R.** *Postglacial dispersal of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) on the Iberian peninsula reconstructed from nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation.* Evolution 56: 792–803 (2002)
- Brander P, Boujon CE, Bestetti GE.** *Infectious hemorrhagic disease of rabbits in the Bern pathology institute (1988-90): seasonal and regional distribution and histopathological findings.* Schweiz Arch Tierheilkd 134 (8): 383-9 (1992)
- Buddle BM, de Lisle GW, McColl K, Collins BJ, Morrissy C, Westbury HA.** *Response of the North Island brown kiwi, Apteryx australis mantelli and the lesser short-tailed bat, Mystacina tuberculata to a measured dose of rabbit haemorrhagic disease virus.* N Z Vet J 45 (3): 109-13 (1997)

Burmakina G, Malogolovkina N, Lunitsin A, Titov I, Tsybanov S, Malogolovkin A. *Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation*. Arch Virol 161 (7): 1973-9 (2016) doi: 10.1007/s00705-016-2864-1

Burroughs JN, Doel TR, Smale CJ, Brown F. *A model for vesicular exanthema virus, the prototype of the calicivirus group*. J Gen Virol 40 (1): 161-74 (1978)

Calvete C, Estrada R, Lucientes J, Osacar JJ, Villafuerte R. *Effects of vaccination against viral haemorrhagic disease and myxomatosis on long-term mortality rates of European wild rabbits*. Vet Rec 155 (13): 388-92 (2004)

Calzada J, Guzmán N, Rodríguez A. *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Lince (Jul, 2017)

(www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/ieet_mami_lynx_pardinus_tcm7_22038.pdf)

Camarda A, Pugliese N, Cavadini P, Circella E, Capucci L, Caroli A, Legretto M, Mallia E, Lavazza A. *Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (Oryctolagus cuniculus) and Italian hare (Lepus corsicanus)*. Res Vet Sci 97 (3): 642-5 (2014) doi: 10.1016/j.rvsc.2014.10.008

Camps J. *Lugar de origen del conejo*. Boletín de cunicultura (1994)

Cancellotti FM, Renzi M. *Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy*. Rev Sci Tech 10 (2): 409-22 (1991)

Capilla C. *Eliminación de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo*. Lagomorpha, 96 (1998)

Capucci L, Scicluna MT, Lavazza A. *Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome*. Rev Sci Tech. 1991 Jun;10(2):347-70

Capucci L, Chasey D, Lavazza A, Westcott D. *Preliminary characterization of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom*. Zentralbl Veterinarmed B 43 (4): 245-50 (1996)

Capucci L, Fusi P, Lavazza A, Pacciarini ML, Rossi C. *Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic*. J Virol 70 (12): 8614-23 (1996)

Capucci L, Nardin A, Lavazza A. *Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus*. Vet Rec 21; 140 (25): 647-50 (1997)

Capucci L, Fallacara F, Grazioli S, Lavazza A, Pacciarini ML, Brocchi E. *A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant*. Virus Res 58 (1-2): 115-26 (1998)

Capucci L, Cavadini P, Schiavitto M, Lombardi G, Lavazza A. *Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2)*. Vet Rec (2017) doi:pii: vetrec-2016-104132. 10.1136/vr.104132

- Carman** JA, Garner MG, Catton MG, Thomas S, Westbury HA, Cannon RM, Collins BJ, Tribe IG. *Viral haemorrhagic disease of rabbits and human health*. Epidemiol Infect 121 (2): 409-18 (1998)
- Carvalho** CL, Carvalho IL, Zé-Zé L, Nuncio MS, Duarte EL. *Tularaemia: A challenging zoonosis*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 37: 85– 96 (2014)
- Castañón** S, Marín MS, Martín-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordás RJ, Parra F. *Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus*. J Virol 73 (5): 4452-5 (1999)
- Clutton-Brock**, J. *A Natural History of Domesticated Mammals. The European Rabbit: The History and Biology of a Successful Colonizer*. Oxford University Press (1999)
- Collery** PM, Mooney J, O'Conner M, Nowotny N. *Rabbit haemorrhagic disease in Ireland*. Vet Rec 18; 137 (21): 547 (1995)
- Collins** BJ, White JR, Lenghaus C, Boyd V, Westbury HA. *A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus*. Vet Microbiol 43 (1): 85-96 (1995)
- Collins** BJ, White JR, Lenghaus C, Morrissy CJ, Westbury HA. *Presence of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in rabbit tissues as revealed by a monoclonal antibody dependent capture ELISA*. J Virol Methods 26; 58 (1-2): 145-54 (1996)
- Cooke** BD, Robinson AJ, Merchant JC, Nardin A, Capucci L. *Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia*. Epidemiol Infect 124 (3): 563-76 (2000)
- Cordero del Campillo** M.; Rojo F.A; Martínez A.R. *Parasitología veterinaria*. McGraw-Hill (1999)
- Crespo** I, Miguel BS, Laliena A, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. *Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin*. J Pineal Res 49 (2): 193-200 (2010) doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00787
- Crespo** I, San-Miguel B, Sánchez DI, González-Fernández B, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. *Melatonin inhibits the sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin*. J Pineal Res 61 (2): 168-76 (2016) doi: 10.1111/jpi.12335
- Crisci** E, Almanza H, Mena I, Córdoba L, Gómez-Casado E, Castón JR, Fraile L, Bárcena J, Montoya M. *Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant*. Virology 387 (2): 303-12 (2009) doi: 10.1016/j.virol.2009.02.045
- Crisci** E, Fraile L, Moreno N, Blanco E, Cabezón R, Costa C, Mussá T, Baratelli M, Martinez-Orellana P, Ganges L, Martínez J, Bárcena J, Montoya M. *Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs*. Vaccine 30 (14): 2427-39 (2012) doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.069
- Chapman** JA, Flux JEC. *Introduction and overview of the lagomorphs. Rabbits, Hares and Pikas: Status Survey and Conservation Action Plan*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland (1990)

- Chasey D**, Lucas M, Westcott D, Williams M. *European brown hare syndrome in the U.K.; a calicivirus related to but distinct from that of viral haemorrhagic disease in rabbits*. Arch Virol 124 (3-4): 363-70 (1992)
- Chasey D**, Lucas M, Bishop C. *Rabbit haemorrhagic disease*. Vet Rec 134 (5): 123 (1994)
- Chasey D**. *Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom*. Vet Rec 135 (21): 496-9 (1994)
- Chen SY**, Chou CC, Liu CI, Shien JH. *Impairment of renal function and electrolyte balance in rabbit hemorrhagic disease*. J Vet Med Sci 70 (9): 951-8 (2008)
- Chen SY**, Shien JH, Ooi HK. *Hyperlipidemia in rabbit hemorrhagic disease*. Exp Anim 57 (5): 479-83 (2008)
- Chen M**, Song Y, Fan Z, Jiang P, Hu B, Xue J, Wei H, Wang F. *Immunogenicity of different recombinant rabbit hemorrhagic disease virus-like particles carrying CD8+ T cell epitope from chicken ovalbumin (OVA)*. Virus Res 183: 15-22 (2014) doi: 10.1016/j.virusres.2014.01.004
- Cheng Y**, Chen Z, Li C, Meng C, Wu R, Liu G. *Protective immune responses in rabbits induced by a suicidal DNA vaccine of the VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus*. Antiviral Res 97 (3): 227-31 (2013) doi: 10.1016/j.antiviral.2012.12.028
- Dalton KP**, Nicieza I, Balseiro A, Muguerza MA, Rosell JM, Casais R, Álvarez ÁL, Parra F. *Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain*. Emerg Infect Dis (12): 2009-12 (2012) doi: 10.3201/eid1812.120341
- Dalton KP**, Nicieza I, Balseiro A, Muguerza MA, Rosell JM, Casais R, Álvarez AL, Parra F. *Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain*. Emerging Infectious Diseases 18 (12) (2012) DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120341>
- Dalton KP**, Nicieza I, Abrantes J, Esteves PJ, Parra F. *Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula*. Vet Microbiol 169 (1-2): 67-73 (2014) doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.015
- Dalton KP**, Abrantes J, Lopes AM, Nicieza I, Álvarez ÁL, Esteves PJ, Parra F. *Complete genome sequence of two rabbit hemorrhagic disease virus variant b isolates detected on the Iberian Peninsula*. Arch Virol 160 (3): 877-81 (2015) doi: 10.1007/s00705-014-2329-3
- Dalton KP**, Nicieza I, Podadera A, de Llano D, Martín Alonso JM, de Los Toyos JR, García Ocaña M, Vázquez-Villa F, Velasco B, Landeta O, Parra F. *Fast specific field detection of RHDVb*. Transbound Emerg Dis (2017) doi: 10.1111/tbed.12607
- Delibes-Mateos M**, Ferreira C, Carro F, Escudero MA, Gortázar C. *Ecosystem Effects of Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, Iberian Peninsula*. Emerging Infectious Diseases 20 (12) (2014)
- DeSheng K**, HuaiRan L, JiaSen L, Zuo Y, Qian J, DongChun G, XiaoLiang H, FengJie W, QianQian H, LianDong Q. *Identification of two novel rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) B cell epitopes and evaluation of its immunoprotection against RHDV*. Appl Microbiol Biotechnol 99 (14): 5951-66 (2015) doi: 10.1007/s00253-015-6571-8

Di Giallonardo F, Holmes EC. *Viral biocontrol: grand experiments in disease emergence and evolution.* Trends Microbiol (2014) doi:pii: S0966-842X(14)00214-5. 10.1016/j.tim.2014.10.004

Du NX. *Molecular biology of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits.* Rev Sci Tech 10 (2): 325-36 (1991)

Duarte MD, Henriques AM, Barros S, Luís T, Fagulha T, Ramos F, Fevereiro M. *New insight into the epidemiology of rabbit hemorrhagic disease viruses in Portugal: retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of G1 and G6 strains in mainland until 2008.* Infect Genet Evol 27: 149-55 (2014) doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.017

Duarte M, Henriques M, Barros SC, Fagulha T, Ramos F, Luís T, Fevereiro M, Benevides S, Flor L, Barros SV, Bernardo S. *Detection of RHDV variant 2 in the Azores.* Vet Rec 176 (5): 130 (2015) doi: 10.1136/vr.h497

Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, Luís T, Duarte EL, Fevereiro M. *A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2).* J Virol Methods 219: 90-5 (2015) doi: 10.1016/j.jviromet.2015.03.017

Duarte M, Carvalho C, Bernardo S, Barros SV, Benevides S, Flor L, Monteiro M, Marques I, Henriques M, Barros SC, Fagulha T, Ramos F, Luís T, Fevereiro M. *Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains.* Infect Genet Evol 35: 163-71 (2015) doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.005

Duarte M, Henriques M, Barros SC, Fagulha T, Ramos F, Luís T, Fevereiro M, Carvalho C, Benevides S, Flor L, Barros SV, Bernardo S. *Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores.* Vet Rec 176 (19): 499-500 (2015) doi: 10.1136/vr.h2402

Eden JS, Kovaliski J, Duckworth JA, Swain G, Mahar JE, Strive T, Holmes EC. *Comparative Phylodynamics of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Australia and New Zealand.* J Virol 89 (18): 9548-58 (2015) doi: 10.1128/JVI.01100-15

Eden JS, Read AJ, Duckworth JA, Strive T, Holmes EC. *Resolving the Origin of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Insights from an Investigation of the Viral Stocks Released in Australia.* J Virol 89 (23): 12217-20 (2015) doi: 10.1128/JVI.01937-15

Esteves PJ, Abrantes J, Carneiro M, Müller A, Thompson G, van der Loo W. *Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV).* Virus Res 137 (2): 253-6 (2008) doi: 10.1016/j.virusres.2008.07.025

Esteves PJ, Lopes AM, Magalhães MJ, Pinheiro A, Gonçalves D, Abrantes J. *Rabbit hemorrhagic disease virus detected in Pico, Azores, Portugal, revealed a unique endemic strain with more than 17 years of independent evolution.* Viruses 6 (7): 2698-707 (2014) doi: 10.3390/v6072698

Estrabón. *Geografía de Iberia* (Traducción: Espelosín JG). Alianza Editorial, Madrid (2007)

Farnós O, Boué O, Parra F, Martín-Alonso JM, Valdés O, Joglar M, Navea L, Naranjo P, Leonart R. *High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit*

hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in Pichia pastoris. J Biotechnol 117 (3): 215-24 (2005)

Farnós O, Rodríguez M, Chiong M, Parra F, Boué O, Lorenzo N, Colás M, Lleonart R. *The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein obtained from Pichia pastoris induces a strong humoral and cell-mediated immune response following intranasal immunization in mice*. Vet Microbiol 114 (3-4): 187-95 (2006)

Farnós O, Rodríguez D, Valdés O, Chiong M, Parra F, Toledo JR, Fernández E, Lleonart R, Suárez M. *Molecular and antigenic characterization of rabbit hemorrhagic disease virus isolated in Cuba indicates a distinct antigenic subtype*. Arch Virol 152 (6): 1215-21 (2007)

Farnós O, Fernández E, Chiong M, Parra F, Joglar M, Méndez L, Rodríguez E, Moya G, Rodríguez D, Lleonart R, González EM, Alonso A, Alfonso P, Suárez M, Rodríguez MP, Toledo JR. *Biochemical and structural characterization of RHDV capsid protein variants produced in Pichia pastoris: advantages for immunization strategies and vaccine implementation*. Antiviral Res 81 (1): 25-36 (2009) doi: 10.1016/j.antiviral.2008.08.007

Fenner F, Fantini B. *Biological Control of Vertebrate Pests. The History of Myxomatosis – an Experiment in Evolution*. CAB International, New York, USA (1999)

Fenner F, Ratcliffe FN. *Myxomatosis*. Cambridge University Press, London, UK. (1965)

Fenner F, Marshall ID. *A comparison of the virulence for European rabbits (Oryctolagus cuniculus) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America*. Hyg 55, 2 (1957)

Fernández-Fernández MR, Mouriño M, Rivera J, Rodríguez F, Plana-Durán J, García JA. *Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector*. Virology 280 (2): 283-91 (2001)

Fernández E, Toledo JR, Chiong M, Parra F, Rodríguez E, Montero C, Méndez L, Capucci L, Farnós O. *Single dose adenovirus vectored vaccine induces a potent and long-lasting immune response against rabbit hemorrhagic disease virus after parenteral or mucosal administration*. Vet Immunol Immunopathol 142 (3-4): 179-88 (2011) doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.007

Fernández E, Toledo JR, Méndez L, González N, Parra F, Martín-Alonso JM, Limonta M, Sánchez K, Cabrales A, Estrada MP, Rodríguez-Mallón A, Farnós O. *Conformational and thermal stability improvements for the large-scale production of yeast-derived rabbit hemorrhagic disease virus-like particles as multipurpose vaccine*. PLoS One 8(2):e56417 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0056417

Fernández E, Toledo JR, Mansur M, Sánchez O, Gil DF, González-González Y, Lamazares E, Fernández Y, Parra F, Farnós O. *Secretion and assembly of calicivirus-like particles in high-cell-density yeast fermentations: strategies based on a recombinant non-specific BPTI-Kunitz-type protease inhibitor*. Appl Microbiol Biotechnol 99 (9): 3875-86 (2015) doi: 10.1007/s00253-014-6171-z

Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJ, Aguas AP. *Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease*. Res Vet Sci 76 (1): 83-94 (2004)

- Ferreira** PG, Costa-E-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJ, Aguas AP. *Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD)*. Vet Res Commun 30 (4): 393-401 (2006)
- Ferreira** PG, Costa-e-Silva A, Aguas AP. *Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes*. Res Vet Sci 81 (3): 362-5 (2006)
- Ferreira** PG, Costa-e-Silva A, Oliveira MJ, Monteiro E, Cunha EM, Aguas AP. *Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection*. Res Vet Sci 80 (2): 218-25 (2006)
- Ferreira** PG, Dinís M, Costa-E-Silva A, Aguas AP. *Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits*. Vet Immunol Immunopathol 121 (3-4): 364-9 (2008)
- Fischer** L, Le Gros FX, Mason PW, Paoletti E. *A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge*. Vaccine 15 (1): 90-6 (1997)
- Flux** JEC. *World distribution. The European Rabbit: The History and Biology of a Successful Colonizer*. Oxford University Press, Oxford (1994)
- Fox** RR. *Taxonomy and genetics. The Biology of the Laboratory Rabbit*. Academic Press, San Diego (1994)
- Forrester** NL, Trout RC, Gould EA. *Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire*. Virology 358 (1): 18-22 (2007)
- Fouchet** D, Le Pendu J, Guitton JS, Guiserix M, Marchandeau S, Pontier D. *Evolution of microparasites in spatially and genetically structured host populations: the example of RHDV infecting rabbits*. J Theor Biol 257 (2): 212-27 (2009) doi: 10.1016/j.jtbi.2008.11.021
- Frölich** K, Klima F, Dedek J. *Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free-ranging red foxes from Germany*. J Wildl Dis 34 (3): 436-42 (1998)
- Fuller** HE, Chasey D, Lucas MH, Gibbens JC. *Rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom*. Vet Rec 133 (25-26): 611-3 (1993)
- Fuchs** A, Weissenböck H. *Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS)*. J Comp Pathol 107 (1): 103-13 (1992)
- Gall** A, Schirrmeier H. *Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus genome in vaccinated rabbits after experimental infection*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53 (8): 358-62 (2006)
- Gao** J, Meng C, Chen Z, Li C, Liu G. *Codon optimization of the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) capsid gene leads to increased gene expression in Spodoptera frugiperda 9 (Sf9) cells*. J Vet Sci 14 (4): 441-7 (2013)
- Gil** F, Titarenko E, Terrada E, Arcalís E, Escribano JM. *Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies*. Plant Biotechnol J 4 (1): 135-43 (2006)

Gómez-Lucía E, Blanco MM, Doménech A. *Manual de inmunología veterinaria*. Ed. Pearson Educación, España (2007)

González R. *La importancia de las razas autóctonas en la moderna cunicultura* (Jul, 2017) (<http://axoncomunicacion.net/news/new/IdNew/349/Option/3.%20>)

Górski J, Mizak B, Chrobocińska M. *Control of viral haemorrhagic disease of rabbits in Poland*. Rev Sci Tech 13 (3): 881-91 (1994)

Gould AR, Kattenbelt JA, Lenghaus C, Morrissy C, Chamberlain T, Collins BJ, Westbury HA. *The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation*. Virus Res 47 (1): 7-17 (1997)

Gould EA. *First case of rabbit haemorrhagic disease in Canada: contaminated flying insect, vs. long-term infection hypothesis*. Mol Ecol 21 (5): 1042-7 (2012) doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05462

Gracia E, Baselga R, Fernández A, Albizu I, Villa A. *Etiología de las diarreas en conejos*. Boletín de cunicultura 131 (2004)

Graham DA, Cassidy J, Beggs N, Curran WL, McLaren IE, Connor TJ, Kennedy S. *Rabbit viral haemorrhagic disease in Northern Ireland*. Vet Rec 138 (2): 47 (1996)

Granzow H, Weiland F, Strebelow HG, Liu CM, Schirrmeier H. *Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates*. Virus Res 41 (2): 163-72 (1996)

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. *Taxonomy of the caliciviruses*. J Infect Dis 181 (2): S322-30 (2000)

Gregg DA, House C, Meyer R, Berninger M. *Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization*. Rev Sci Tech 10 (2): 435-51 (1991)

Gregg, D. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees*. OIE (1992)

Gromadzka B, Szewczyk B, Konopa G, Fitzner A, Kesy A. *Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus*. Acta Biochim Pol 53 (2): 371-6 (2006)

Guittre C, Baginski I, Le Gall G, Prave M, Trépo C, Cova L. *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction*. Res Vet Sci 58 (2): 128-32 (1995)

Guittre C, Ruvoen-Clouet N, Barraud L, Cherel Y, Baginski I, Prave M, Ganiere JP, Trépo C, Cova L. *Early stages of rabbit haemorrhagic disease virus infection monitored by polymerase chain reaction*. Zentralbl Veterinarmed B 43 (2): 109-18 (1996)

Hall RN, Mahar JE, Haboury S, Stevens V, Holmes EC, Strive T. *Emerging Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDVb), Australia*. Emerg Infect Dis 21 (12): 2276-8 (2015) doi: 10.3201/eid2112.151210

- Hall RN**, Peacock DE, Kovaliski J, Mahar JE, Mourant R, Piper M, Strive T. *Detection of RHDV2 in European brown hares (Lepus europaeus) in Australia*. Vet Rec 180 (5): 121 (2017) doi: 10.1136/vr.104034
- Halls AE**. *Enteric Diseases in Rabbits*. Nutreco Canada Inc. (Jul, 2017) (<http://www.nutrecocanada.com/docs/shur-gain---specialty/enteric-diseases-in-rabbits.pdf>)
- Heneidi Zeckua A**, Zepeda Sein C, Mateos Poumián A, Velázquez G. *Model for evaluating the risk of introducing rabbit viral hemorrhagic disease based on experience in Mexico*. Rev Sci Tech 16 (1): 91-103 (1997)
- Henning J**, Davies P. *A serial cross-sectional study of the prevalence of rabbit haemorrhagic disease on three farms in the lower North Island of New Zealand*. N Z Vet J 53 (2): 149-53 (2005)
- Henning J**, Meers J, Davies PR, Morris RS. *Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment*. Epidemiol Infect 133 (4): 719-30 (2005)
- Henning J**, Meers J, Davies PR. *Exposure of rabbits to ultraviolet light-inactivated rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) and subsequent challenge with virulent virus*. Epidemiol Infect 133 (4): 731-5 (2005)
- Hill WA**, Brown JP. *Zoonoses of Rabbits and Rodents*. Vet Clin Exot Anim 14: 519-531 (2011) doi:10.1016/j.cvex.2011.05.009
- Hoffman RS**. *Order Lagomorpha. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Institution Press, Washington (1993)
- Hu Z**, Tian X, Zhai Y, Xu W, Zheng D, Sun F. *Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus*. Protein Cell 1 (1): 48-58 (2010) doi: 10.1007/s13238-010-0007-0
- Hu B**, Wang F, Fan Z, Song Y, Abrantes J, Zuo Y, Esteves PJ. *Recombination between G2 and G6 strains of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in China*. Arch Virol 162 (1): 269-272 (2017) doi: 10.1007/s00705-016-3082-6
- Huang HB**. *Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China*. Rev Sci Tech 10 (2): 481-98 (1991)
- Hukowska-Szematowicz B**, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. *Genetic variation and phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains*. Acta Biochim Pol 59 (4): 459-65 (2012)
- Hukowska-Szematowicz B**, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. *Analysis of genetic variability and phylogenetic analysis of selected Czech and French strains of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. J Appl Genet 54 (2): 235-48 (2013) doi: 10.1007/s13353-013-0140-6
- ISU** (Iowa state university). *Rabbit Hemorrhagic Disease*. Viral Hemorrhagic Disease of Rabbits, Rabbit Calicivirus Disease (2007)
- Jahnke M**, Holmes EC, Kerr PJ, Wright JD, Strive T. *Evolution and phylogeography of the nonpathogenic calicivirus RCV-A1 in wild rabbits in Australia*. J Virol 84 (23): 12397-404 (2010) doi: 10.1128/JVI.00777-10

- Johnson-Delaney** CA, Orosz SE. *Rabbit Respiratory System: Clinical Anatomy, Physiology and Disease*. Vet Clin Exot Anim 14: 257–266 (2011)
- Joubert** P, Pautigny C, Madelaine MF, Rasschaert D. *Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of rabbit haemorrhagic disease virus*. J Gen Virol 81 (Pt 2): 481-8 (2000)
- Jung** JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH, Lee YS. *Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease*. J Comp Pathol 123 (2-3): 135-40 (2000)
- Kerr** PJ, Kitchen A, Holmes EC. *Origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus*. J Virol 83 (23): 12129-38 (2009) doi: 10.1128/JVI.01523-09
- Kerr** PJ, Donnelly TM. *Viral infections of rabbits*. Vet Clin Exot Anim 16: 437-468 (2013)
- Kesy** A, Fitzner A, Niedbalski W, Paprocka G, Walkowiak B. *A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbits virus*. Rev Sci Tech 15 (3): 1029-35 (1996)
- Kimura** T, Mitsui I, Okada Y, Furuya T, Ochiai K, Umemura T, Itakura C. *Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits*. J Comp Pathol 124 (2-3): 134-41 (2001)
- Kinnear** M, Linde CC. *Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus*. J Gen Virol 91 (Pt 1): 174-81 (2010) doi: 10.1099/vir.0.014076-0
- Kölbl** S, Settele J, Schönbauer M. *The first appearance of infectious hemorrhagic disease of rabbits in Austria*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 103 (8): 261-6 (1990)
- Kovaliski** J. *Monitoring the spread of rabbit hemorrhagic disease virus as a new biological agent for control of wild European rabbits in Australia*. J Wildl Dis 34 (3): 421-8 (1998)
- Kovaliski** J, Sinclair R, Mutze G, Peacock D, Strive T, Abrantes J, Esteves PJ, Holmes EC. *Molecular epidemiology of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Australia: when one became many*. Mol Ecol 23 (2): 408-420 (2013). doi: 10.1111/mec.12596
- Kuttin** ES, Nowohty N, Nyska A, Schilcher F, Waner T. *Rabbit haemorrhagic disease. First outbreak in Israel and review of the literature*. Isr J Vet Med 46: 119–126 (1991)
- Laliena** A, San Miguel B, Crespo I, Alvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. *Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin*. J Pineal Res 53 (3): 270-8 (2012) doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.00995
- Laurent** S, Vautherot JF, Le Gall G, Madelaine MF, Rasschaert D. *Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus*. J Gen Virol 78 (Pt 11): 2803-11 (1997)
- Lavazza** A, Scicluna MT, Capucci L. *Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions*. Zentralbl Veterinarmed B 43 (7): 401-10 (1996)
- Lavazza** A, Cavadini P, Barbieri I, Tizzani P, Pinheiro A, Abrantes J, Esteves PJ, Grilli G, Gioia E, Zanoni M, Meneguz P, Guitton JS, Marchandau S, Chiari M, Capucci L. *Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (Sylvilagus floridanus) is susceptible to*

infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. Vet Res 46: 13 (2015) doi: 10.1186/s13567-015-0149-4

Le Gall G, Boilletot E, Morisse JP. *Viral haemorrhagic disease of rabbit: purification and characterization of a strain isolated in France.* Ann Rech Vet 23 (4): 381-7 (1992)

Le Gall G, Arnauld C, Boilletot E, Morisse JP, Rasschaert D. *Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995.* J Gen Virol 79 (Pt 1): 11-6 (1998)

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, de Boisséson C, Portejoie Y, Rasschaert D. *Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants.* Arch Virol 148 (1): 65-81 (2003)

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Fages MP, Bertagnoli S, Gelfi J, Aubineau J, Roobrouck A, Botti G, Lavazza A, Marchandeau S. *Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV.* Virology 410 (2): 395-402 (2011) doi: 10.1016/j.virol.2010.12.001

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guérin JL, Marchandeau S. *Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France.* Vet Rec 168 (5): 137-8 (2011) doi: 10.1136/vr.d697

Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin JL, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Le Normand B, Capucci L. *Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus.* Vet Res 44: 81 (2013) doi: 10.1186/1297-9716-44-81

Lennox AM, Kelleher S. *Bacterial and Parasitic Diseases of Rabbits.* Vet Clin Exot Anim 12: 519–530 (2009)

Leuthold MM, Dalton KP, Hansman GS. *Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens.* J Virol 89 (4): 2378-87 (2015) doi: 10.1128/JVI.02832-14

Li ZX, Hu WD, Li BC, Li TY, Zhou XY, Zhang Z. *Egg yolk IgY against RHDV capsid protein VP60 promotes rabbit defense against RHDV infection.* Vet Immunol Immunopathol 157 (1-2): 97-104 (2014) doi: 10.1016/j.vetimm.2013.10.002

Liebenberg SP, Linn JM. *Seasonal and sexual influences on rabbit atropinesterase.* Lab. Anim. 14, 297–300 (1980)

Liebermann H, Bergmann H, Lange E, Schirrmeier H, Solisch P. *Some physicochemical properties of the virus of rabbit haemorrhagic disease.* Zentralbl Veterinarmed B 39 (5): 317-26 (1992)

Liu J, Kerr PJ, Wright JD, Strive T. *Serological assays to discriminate rabbit haemorrhagic disease virus from Australian non-pathogenic rabbit calicivirus.* Vet Microbiol 157 (3-4): 345-54 (2012) doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.018

Liu J, Kerr PJ, Strive T. *A sensitive and specific blocking ELISA for the detection of rabbit calicivirus RCV-A1 antibodies.* Virol J 9: 182 (2012) doi: 10.1186/1743-422X-9-182

- Liu J**, Fordham DA, Cooke BD, Cox T, Mutze G, Strive T. *Distribution and prevalence of the Australian non-pathogenic rabbit calicivirus is correlated with rainfall and temperature.* PLoS One 9(12):e113976 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0113976
- Liu MM**, Lei XY, Yu H, Zhang JZ, Yu XJ. *Correlation of cytokine level with the severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome.* Virol. J 14(1) (2017) doi: 10.1186/s12985-016-0677-1
- Liu SJ**, Xue HP, Pu BQ, Quian NH. *A new viral disease in rabbits.* Anim Husb Vet Med 16: 253–255 (1984)
- Liu X**, Hu B, Wang F, Song Y, Fan Z, Wei H, Qiu R, Xu W. *Molecular cloning of the rabbit interleukin 6 promoter: Functional characterization of rabbit hemorrhagic disease virus response elements in RK-13 cells.* Dev Comp Immunol 65: 280-8 (2016) doi: 10.1016/j.dci.2016.07.017
- Löliger HC**, Eskens U. *Incidence, epizootiology and control of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Germany.* Rev Sci Tech 10 (2): 423-34 (1991)
- Lopes AM**, Marques S, Silva E, Magalhães MJ, Pinheiro A, Alves PC, Le Pendu J, Esteves PJ, Thompson G, Abrantes J. *Detection of RHDV strains in the Iberian hare (Lepus granatensis): earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection.* Vet Res 45 (1): 94 (2014)
- Lopes AM**, Correia J, Abrantes J, Melo P, Ramada M, Magalhães MJ, Alves PC, Esteves PJ. *Is the New Variant RHDV Replacing Genogroup 1 in Portuguese Wild Rabbit Populations?* Viruses 7 (1): 27-36 (2014) doi: 10.3390/v7010027
- Lopes AM**, Dalton KP, Magalhães MJ, Parra F, Esteves PJ, Holmes EC, Abrantes J. *Full genomic analysis of new variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDVb) revealed multiple recombination events.* J Gen Virol 96 (Pt 6): 1309-19 (2015) doi:pii: vir.0.000070. 10.1099/vir.0.000070
- Lopes AM**, Magalhães MJ, Alves PC, Esteves PJ, Abrantes J. *An update on the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) strains circulating in Portugal in the 1990s: earliest detection of G3-G5 and G6.* Arch Virol 162 (7): 2061-2065 (2017) doi: 10.1007/s00705-017-3318-0
- Lopez-Martinez N**. *The lagomorph fossil record and the origin of the European rabbit. Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation.* Springer-Verlag, Berlin (2008)
- Lugton IW**. *A cross-sectional study of risk factors affecting the outcome of rabbit haemorrhagic disease virus releases in New South Wales.* Aust Vet J 77 (5): 322-8 (1999)
- Luque D**, González JM, Gómez-Blanco J, Marabini R, Chichón J, Mena I, Angulo I, Carrascosa JL, Verdager N, Trus BL, Bárcena J, Castón JR. *Epitope insertion at the N-terminal molecular switch of the rabbit hemorrhagic disease virus T = 3 capsid protein leads to larger T = 4 capsids.* J Virol 86 (12): 6470-80 (2012) doi: 10.1128/JVI.07050-11
- Machín A**, Martín Alonso JM, Parra F. *Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation.* J Biol Chem 276 (30): 27787-92 (2001)

- Mahar** JE, Nicholson L, Eden JS, Duchêne S, Kerr PJ, Duckworth J, Ward VK, Holmes EC, Strive T. *Benign Rabbit Caliciviruses Exhibit Evolutionary Dynamics Similar to Those of Their Virulent Relatives*. J Virol 90 (20): 9317-29 (2016) doi: 10.1128/JVI.01212-16
- MAPAMA**. *Plan de Vigilancia de la mixomatosis y de la enfermedad hemorrágica del conejo*, 2014 (Jul, 2017)
- MAPAMA**. *Informe de resultados del Plan de Vigilancia 2015 de la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica del conejo* (Jul, 2017) (http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/resultadosprogramaconejos2015_tcm7-415487.pdf)
- MAPAMA**. Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria en Fauna Silvestre (Jul, 2017) (http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnvs_fauna_silvestre_tcm7-453284.pdf)
- Marcato** PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P. *Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome*. Rev Sci Tech 10 (2): 371-92 (1991)
- Marchandeau** S, Le Gall-Reculé G, Bertagnoli S, Aubineau J, Botti G, Lavazza A. *Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus*. Vet Res 36 (1): 53-62 (2005)
- Marín** MS, Martín Alonso JM, Pérez Ordoyo García LI, Boga JA, Argüello-Villares JL, Casais R, Venugopal K, Jiang W, Gould EA, Parra F. *Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine*. Virus Res 39 (2-3): 119-28 (1995)
- Marlier** D, Mainil J, Linden A, Vindevogel H. *Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of amyxomatous myxoma virus strains*. Vet J 159: 171–178 (2000)
- Marques** RM, Costa-E-Silva A, Aguas AP, Teixeira L, Ferreira PG. *Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits*. Vet Res Commun 34 (8): 659-68 (2010) doi: 10.1007/s11259-010-9437-7
- Marques** RM, Costa-E-Silva A, Águas AP, Teixeira L, Ferreira PG. *Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection*. Vet Immunol Immunopathol 150 (3-4): 181-8 (2012) doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.038
- Marques** RM, Teixeira L, Aguas AP, Ribeiro JC, Costa-e-Silva A, Ferreira PG. *Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)*. Vet Res 45: 14 (2014) doi: 10.1186/1297-9716-45-14
- Marques** RM. Tesis Doctoral *Doença hemorrágica do coelho: mecanismos que conferem resistência ou suscetibilidade à infeçao por calicivírus*. Instituto Ciencias Biomédicas da Universidad do Porto (2014)
- Martín-Alonso** JM, Castañón S, Alonso P, Parra F, Ordás R. *Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein*. Transgenic Res 12 (1): 127-30 (2003)
- Martin-Alonso** A, Martin-Carrillo N, Garcia-Livia K, Valladares B, Foronda P. *Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) at the gates of the African continent*. Infect Genet Evol 44: 46-50 (2016) doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.034

Martínez-Torrecuadrada JL, Cortés E, Vela C, Langeveld JP, Meloen RH, Dalsgaard K, Hamilton WD, Casal JL. *Antigenic structure of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus*. J Gen Virol 79 (Pt 8): 1901-9 (1998)

Mateo A. *Enterocolitis epizootica del conejo: Actualización*. Lagomorpha 112 (2000)

Maté M, Mora J, Boscá AR, Aguado F. Trastornos de la regulación de la temperatura (Jul, 2017) (<http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/Manual%20de%20urgencias%20y%20Emergencias/temp.pdf>)

Matiz K, Ursu K, Kecskeméti S, Bajmócy E, Kiss I. *Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated between 1988 and 2003 in eastern Hungary*. Arch Virol 151 (8): 1659-66 (2006)

McColl KA, Morrissy CJ, Collins BJ, Westbury HA. *Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus in decomposing rabbit carcasses*. Aust Vet J 80 (5): 298-9 (2002)

McGowan S, Choudhury B. *Update on rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain*. Vet Rec 178 (26): 662-3 (2016) doi: 10.1136/vr.i3449

McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, Lu Z, Moran KE, Burrage TG, Neilan JG, Ward GB, Botti G, Capucci L, Metwally SA. *A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas*. Virol J 4:96 (2007)

Meng J, Wyss AR. *Glires (Lagomorpha, Rodentia). The Rise of Placental Mammals: Origins and Relationships of the Major Extant Clades*. Johns Hopkins University Press, Baltimore (2005)

Merchán T, Rocha G, Alda F, Silva E, Thompson G, de Trucios SH, Pagés A. *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (Oryctolagus cuniculus)*. Infect Genet Evol 11 (6): 1469-74 (2011) doi: 10.1016/j.meegid.2011.05.001

Meredith AL. *Viral Skin Diseases of the Rabbit*. Vet Clin Exot Anim 16: 705–714 (2013)

Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochiai K, Itakura C. *Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus*. Res Vet Sci 66 (3): 237-42 (1999)

Mikschofsky H, Schirrmeier H, Keil GM, Lange B, Polowick PL, Keller W, Broer I. *Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus*. Plant Biotechnol J 7 (6): 537-49 (2009) doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00422

Mikschofsky H, Hartmann A, Janczyk P, Keil GM, König P, Schirrmeier H, Hammer M, Junghans H, Schmidt K, Schmidtke J, Souffrant WB, Schwerin M, Broer I. *Expression of the Viral Antigen VP60 in Transgenic Potatoes and Its Effect on the Nutritional Composition of Tubers*. Food and Nutrition Sciences. 2 (2): 74-86 (2011) doi:10.4236/fns.2011.22010

Monterroso P, Garrote G, Serronha A, Santos E, Delibes-Mateos M, Abrantes J, Perez de Ayala R, Silvestre F, Carvalho J, Vasco I, Lopes AM, Maio E, Magalhães MJ, Mills LS, Esteves PJ, Simón MÁ, Alves PC. *Disease-mediated bottom-up regulation: An emergent virus affects a keystone prey, and alters the dynamics of trophic webs*. Sci Rep 6:36072 (2016) doi: 10.1038/srep36072

- Moreno** N, Mena I, Angulo I, Gómez Y, Crisci E, Montoya M, Castón JR, Blanco E, Bárcena J. *Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses*. Sci Rep 6:31844 (2016) doi: 10.1038/srep31844
- Moss** SR, Turner SL, Trout RC, White PJ, Hudson PJ, Desai A, Armesto M, Forrester NL, Gould EA. *Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus*. J Gen Virol 83 (Pt 10): 2461-7 (2002)
- Motha** MX, Kittelberger R. *Evaluation of three tests for the detection of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits*. Vet Rec 143 (23): 627-9 (1998)
- Moussa** A, Chasey D, Lavazza A, Capucci L, Smíd B, Meyers G, Rossi C, Thiel HJ, Vlášak R, Rønsholt L. *Haemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus*. Vet Microbiol 33 (1-4): 375-81 (1992)
- MSSSI**. *Informe de situación y evaluación del riesgo de la tularemia en España, 2013* (Jul, 2017) (https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/evRiTul_04_13.pdf)
- Muller** A, Freitas J, Silva E, Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Abrantes J, Esteves PJ, Alves PC, van der Loo W, Kolodziejek J, Nowotny N, Thompson G. *Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) from the Iberian Peninsula*. Vet Microbiol 135 (3-4): 368-73 (2009) doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.057
- Munks** MW, McKee AS, MacLeod MK, Powell RL, Degen JL, Reisdorph NA, Kappler JW, Marrack P. *Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps in vivo*. Blood 116 (24) (2010)
- Murphy** FA. *Veterinary virology*. Elsevier, USA (1999)
- Mutze** G, Cooke B, Alexander P. *The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia*. Journal of Wildlife Diseases 34(2): 221-227 (1998) doi: 10.7589/0090-3558-34.2.221
- Nagesha** HS, Wang LF, Hyatt AD, Morrissy CJ, Lenghaus C, Westbury HA. *Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus*. Arch Virol 140 (6): 1095-1108 (1995)
- Nagesha** HS, Wang LF, Hyatt AD. *Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers*. Arch Virol 144 (12): 2429-39 (1999)
- Nagesha** HS, McColl KA, Collins BJ, Morrissy CJ, Wang LF, Westbury HA. *The presence of cross-reactive antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in Australian wild rabbits prior to the escape of virus from quarantine*. Arch Virol 145 (4): 749-57 (2000)
- Nardelli** S, Agnoletti F, Costantini F, Parpajola R. *Diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS) by indirect sandwich polyclonal ELISA*. Zentralbl Veterinarmed B 43 (7): 393-400 (1996)
- Neill** JD. *Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus: identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus capsid proteins*. Virus Res 24 (2): 211-22 (1992)

- Niedźwiedzka-Rystwej P, Deptuła W.** *White and red blood cells picture in rabbits experimentally infected with RHD virus.* Pol J Vet Sci 14 (3): 479-80 (2011)
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Deptuła W.** *Phagocytosis of neutrophils in rabbits infected with antigenic variants of RHD (rabbit haemorrhagic disease) virus.* Pol J Vet Sci 15 (1): 143-50 (2012)
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Deptuła W.** *Apoptosis of peripheral blood leukocytes from rabbits infected with non-haemagglutinating strains of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV).* Vet Immunol Immunopathol 149 (1-2): 54-7 (2012) doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.012
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Hukowska-Szematowicz B, Tokarz-Deptuła B, Trzeciak-Ryczek A, Działo J, Deptuła W.** *Apoptosis of peripheral blood leucocytes in rabbits infected with different strains of rabbit haemorrhagic disease virus.* Acta Biochim Pol 60 (1): 65-9 (2013)
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Hukowska-Szematowicz B, Działo J, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W.** *Real time PCR detection of rabbit haemorrhagic disease virus in rabbits infected with different European strains of RHDV.* Pol J Vet Sci 16 (1): 39-43 (2013)
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W.** *Apoptosis of granulocytes and lymphocytes in peripheral blood in rabbits infected with haemagglutinating and non-haemagglutinating antigenic variants of the RHD (rabbit haemorrhagic disease) virus.* Pol J Vet Sci 16 (2): 223-9 (2013)
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W.** *Lymphocytes T and B in rabbits infected with RHD virus.* Pol J Vet Sci 16 (3): 563-5 (2013)
- Nowotny N, Bascuñana CR, Ballagi-Pordány A, Gavrier-Widén D, Uhlén M, Belák S.** *Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene.* Arch Virol 142 (4): 657-73 (1997)
- Nyström K, Le Gall-Reculé G, Grassi P, Abrantes J, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Lopes AM, Esteves PJ, Strive T, Marchandeau S, Dell A, Haslam SM, Le Pendu J.** *Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner.* PLoS Pathog 7 (8): e1002188 (2011) doi: 10.1371/journal.ppat.1002188
- Nyström K, Abrantes J, Lopes AM, Le Moullac-Vaidye B, Marchandeau S, Rocher J, Ruvoën-Clouet N, Esteves PJ, Le Pendu J.** *Neofunctionalization of the *Sec1a1*, 2fucosyltransferase paralogue in leporids contributes to glycan polymorphism and resistance to rabbit hemorrhagic disease virus.* PLoS Pathog 11 (4): e1004759 (2015) doi: 10.1371/journal.ppat.1004759
- Oem JK, Lee KN, Roh IS, Lee KK, Kim SH, Kim HR, Park CK, Joo YS.** *Identification and characterization of rabbit hemorrhagic disease virus genetic variants isolated in Korea.* J Vet Med Sci 71 (11): 1519-23 (2009)
- O'Hara P.** *The illegal introduction of rabbit haemorrhagic disease virus in New Zealand.* Rev Sci Tech 25 (1): 119-23 (2006)
- Ohlinger VF, Thiel HJ.** *Identification of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits as a calicivirus.* Rev Sci Tech 10 (2): 311-23 (1991)

Ohlinger VF, Haas B, Thiel HJ. *Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus*. Vet Res 24 (2): 103-16 (1993)

OIE. *Terrestrial Manual. Chapter 2.6.1 Myxomatosis*, 2014 (Jul, 2017)

(http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.06.01_MYXO.pdf)

OIE *Terrestrial Manual. Chapter 2.1.22 Tularemia*, 2016 (Jul, 2017)

(http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.22_TULAREMIA.pdf)

OIE *Technical Disease Cards. Rabbit Haemorrhagic Disease, 2015* (Jul, 2017)
(http://web.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/RHD_FINAL.pdf)

OIE *Terrestrial Manual. Chapter 2.6.2 Rabbit Hemorrhagic Disease*, 2016 (Jul, 2017)
(http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.06.02_RHD.pdf)

O'Keefe JS, Tempero JE, Motha MX, Hansen MF, Atkinson PH. *Serology of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits before and after release of the virus in New Zealand*. Vet Microbiol 66 (1): 29-40 (1999)

Páramo JA. *Disseminated intravascular coagulation*. Med Clin 127:785-9 (2006) doi: 10.1157/13095816

Park JH, Kida H, Ueda K, Ochiai K, Goryo M, Itakura C. *Etiology of rabbit haemorrhagic disease spontaneously occurring in Korea*. Zentralbl Veterinarmed B 38 (10): 749-54 (1991)

Park JH, Ochiai K, Itakura C. *Detection of rabbit haemorrhagic disease virus particles in the rabbit liver tissues*. J Comp Pathol 107 (3): 329-40 (1992)

Park JH, Lee YS, Itakura C. *Fibrin(ogen)-related antigens in rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus*. Res Vet Sci 63 (2): 123-7 (1997)

Parkes JP, Heyward RP, Henning J, Motha MX. *Antibody responses to rabbit haemorrhagic disease virus in predators, scavengers, and hares in New Zealand during epidemics in sympatric rabbit populations*. N Z Vet J 52 (2): 85-9 (2004)

Parra, F; Prieto, M. *Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of the lethal hemorrhagic disease in rabbits*. J Virol 64 (8): 4013-5 (1990)

Peacey M, Wilson S, Baird MA, Ward VK. *Versatile RHDV virus-like particles: incorporation of antigens by genetic modification and chemical conjugation*. Biotechnol Bioeng 98 (5): 968-77 (2007)

Peacock D, Kovaliski J, Sinclair R, Mutze G, Iannella A, Capucci L. *RHDV2 overcoming RHDV immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia*. Vet Rec 180 (11): 280 (2017) doi: 10.1136/vr.104135

Pedler RD, Brandle R, Read JL, Southgate R, Bird P, Moseby KE. *Rabbit biocontrol and landscape-scale recovery of threatened desert mammals*. Conserv Biol 30 (4): 774-82 (2016) doi: 10.1111/cobi.12684

Pérez-Filgueira DM, Resino-Talaván P, Cubillos C, Angulo I, Barderas MG, Barcena J, Escribano JM. *Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV*. Virology 364 (2): 422-30 (2007)

Pérez de Rozas AM, Carabaño R, García J, Rosell J, Díaz JV, Barbé J, Pascual JJ, Badiola I. *Etiopatogenia de la enteropatía epizoótica del conejo*. Boletín de cunicultura 139 (2005)

Peshev R, Christova L. *A comparison of the immunogenic efficacy of a bivalent vaccine against pasteurellosis and rabbit haemorrhagic disease with that of three monovalent vaccines against rabbit haemorrhagic disease*. Vet Res Commun 27 (7): 591-4 (2003)

Philbey AW, Kirkland PD, Saunders GR. *Assessment of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in fox serum as an indicator of infection in sympatric rabbit populations*. Aust Vet J 83 (1-2): 97-100 (2005)

Pinheiro A, Neves F, Lemos de Matos A, Abrantes J, van der Loo W, Mage R, Esteves PJ. *An overview of the lagomorph immune system and its genetic diversity*. Immunogenetics 68 (2): 83-107 (2016) doi: 10.1007/s00251-015-0868-8

Plana J, Vayreda M, Bastons M, Vila X. *Calicivirus: firme candidato como agente inductor de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo*. Med. Vet 6: 87-88 (1989)

Plana-Duran J, Bastons M, Rodriguez MJ, Climent I, Cortés E, Vela C, Casal I. *Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease*. Arch Virol 141 (8): 1423-36 (1996)

Poissonnet C. Tesis Doctoral *Principales maladies du lapin, du cobaye, du Chinchilla, du hámster et du rat de compagnie*. Faculté de Médecine de Créteil (2004)

Prieto JM, Fernandez F, Alvarez V, Espi A, García Marín JF, Alvarez M, Martín JM, Parra F. *Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits*. Res Vet Sci 68 (2): 181-7 (2000)

Pu BQ, Qian NH, Cui S. J. *Micro HA and HI tests for the detection of antibody titres to so-called "haemorrhagic pneumonia" in rabbits*. Chin J Vet Sci Med 11 (10): 16-17 (1985)

Puggioni G, Cavadini P, Maestrale C, Scivoli R, Botti G, Ligios C, Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Capucci L. *The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (Lepus capensis mediterraneus)*. Vet Res 44: 96 (2013) doi: 10.1186/1297-9716-44-96

Ramiro-Ibáñez F, Martín-Alonso JM, García Palencia P, Parra F, Alonso C. *Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology*. Virus Res 60 (1): 21-8 (1999)

Rasschaert D, Huguet S, Madelaine MF, Vautherot JF. *Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit*. Virus Genes 9 (2): 121-32 (1995)

Rocchi M, Maley M, Dagleish M, Vick C, Ryan D, Lee A, Jahns H. *RHDV-2 on the Isle of Man and in the Republic of Ireland*. Vet Rec 179 (15): 389-390 (2016) doi: 10.1136/vr.i5530

Rocha G, Alda F, Pagés A, Merchán T. *Experimental transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) from rabbit to wild mice (Mus spretus and Apodemus sylvaticus) under laboratory conditions*. Infect Genet Evol 47: 94-98 (2017) doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.016

- Rodák** L, Smíd B, Valíček L, Veselý T, Stěpánek J, Hampl J, Jurák E. *Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins*. J Gen Virol 71 (Pt 5): 1075-80 (1990)
- Rohayem** J, Bergmann M, Gebhardt J, Gould E, Tucker P, Mattevi A, Unge T, Hilgenfeld R, Neyts J. *Antiviral strategies to control calicivirus infections*. Antiviral Res 87 (2): 162-78 (2010) doi: 10.1016/j.antiviral.2010.05.002
- Rohde** J, Schirrmeier H, Granzow H, Rziha HJ. *A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)*. Vaccine 29 (49): 9256-64 (2011) doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.121
- Rouco** C, Moreno S, Santoro S. *A case of low success of blind vaccination campaigns against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease on survival of adult European wild rabbits*. Prev Vet Med 133: 108-113 (2016) doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.013
- Rose** KD. *Anagalida: rodents, lagomorphs, and their relatives. Beginning of the Age of Mammals*. Johns Hopkins University Press, Baltimore (2006)
- Rosell** JM, de la Fuente LF. *Causes of mortality in breeding rabbits*. Prev Vet Med 127: 56-63 (2016) doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.03.014
- Rufá** A, Blasco R, Rosell J, Vaquero M. *What is going on at the Molí del Salt site? A zooarchaeological approach to the last hunter-gatherers from South Catalonia*. Historical Biology. 1-21 (2017) Doi: 10.1080/08912963.2017.1315685
- Russell** WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London (1959)
- Ruvoen-Clouet** N, Blanchard D, André-Fontaine G, Ganière JP. *Partial characterization of the human erythrocyte receptor for rabbit haemorrhagic disease virus*. Res Virol 146 (1): 33-41 (1995)
- Ruvoen-Clouet** N, Blanchard D, Andre-Fontaine G, Song B, Ganiere JP. *Detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus: an immunoblotting method using virus-coated human erythrocyte membranes*. Zentralbl Veterinarmed B 42 (4): 197-204 (1995)
- Ruvoen-Clouet** N, Ganière JP, André-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J. *Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to Antigens of the ABH Histo-Blood Group Family*. Journal of Virology 74 (24): 11950-11954 (2000)
- Sánchez-Campos** S, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Tuñón MJ. *Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease*. J Lab Clin Med 144 (4): 215-22 (2004)
- Sandford** JC. *Apuntes sobre la historia del conejo*. Cunicultura (1994)
- San-Miguel** B, Crespo I, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J, González-Gallego J, Tuñón MJ. *Melatonin modulates the autophagic response in acute liver failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus*. J Pineal Res 56 (3): 313-21 (2014) doi: 10.1111/jpi.12124
- Sanson** RL, Brooks HV, Horner GW. *An epidemiological study of the spread of rabbit haemorrhagic disease virus amongst previously non-exposed rabbit populations in the North Island of New Zealand*. N Z Vet J 48 (4): 105-10 (2000)

- Schirrmeier** H, Reimann I, Köllner B, Granzow H. *Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants*. Arch Virol 144 (4): 719-35 (1999)
- Schroder** K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol 75 (2): 163-89 (2004) Epub 2003 Oct 2. DOI: 10.1189/jlb.0603252
- Seal** BS, Neill JD, Ridpath JF. *Predicted stem-loop structures and variation in nucleotide sequence of 3' noncoding regions among animal calicivirus genomes*. Virus Genes 8 (3): 243-7 (1994)
- Selleri** P, Di Girolamo N, Vögtlin A, Fileccia I, Hoop R, Bongiovanni L. *Cutaneous lesions in pet rabbits following subcutaneous administration of a novel bivalent vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease*. Vet Dermatol 25 (6): 563-6 (2014) doi: 10.1111/vde.12165
- Simpson** V, Everest D. *Westcott D.RHDV variant 2 and Capillaria hepatica infection in rabbits*. Vet Rec 174 (19): 486 (2014) doi: 10.1136/vr.g3164
- Smíd** B, Valícek L, Stěpánek J, Jurák E, Rodák L. *Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia*. Zentralbl Veterinarmed B 36 (3): 237-40 (1989)
- Spibey** N, McCabe VJ, Greenwood NM, Jack SC, Sutton D, van der Waart L. *Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease*. Vet Rec 170 (12): 309 (2012) doi: 10.1136/vr.100366
- Spiesschaert** B, McFadden G, Hermans K, Nauwynck H, Van de Walle GR. *The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion*. Veterinary Research 42:76 (2011)
- Stanford** MM, Werden SJ, McFadden G. *Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host*. Vet Res 38: 299-318 (2007)
- Stormont** C, Suzuki Y. *Atropinesterase and cocainesterase of rabbit serum: localization of the enzyme activity in isozymes*. Science 167: 200–202 (1970)
- Strive** T, Wright JD, Robinson AJ. *Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits*. Virology 384 (1): 97-105 (2009) doi: 10.1016/j.virol.2008.11.004
- Strive** T, Wright J, Kovaliski J, Botti G, Capucci L. *The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus*. Virology 398 (1): 125-34 (2010) doi: 10.1016/j.virol.2009.11.045
- Strive** T, Elsworth P, Liu J, Wright JD, Kovaliski J, Capucci L. *The non-pathogenic Australian rabbit calicivirus RCV-A1 provides temporal and partial cross protection to lethal Rabbit Haemorrhagic Disease Virus infection which is not dependent on antibody titres*. Vet Res 44:51 (2013) doi: 10.1186/1297-9716-44-51
- Sun** Y, Jin C, Zhan F, Wang X, Liang M, Zhang Q, Ding S, Guan X, Huo X, Li C, Qu J, Wang Q, Zhang S, Zhang Y, Wang S, Xu A, Bi Z, Li D. *Host cytokine storm is associated*

with disease severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome. J. Infect. Dis. 206(7): 1085-94 (2012) doi: 10.1093/infdis/jis452

Teifke JP, Reimann I, Schirrmeier H. *Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. J Comp Pathol 126 (2-3): 231-4 (2002)

Teijaro JR, Walsh KB, Rice S, Rosen H, Oldstone MB. *Mapping the innate signaling cascade essential for cytokine storm during influenza virus infection* Proc Natl Acad Sci USA 111 (10): 3799-804 (2014) doi: 10.1073/pnas.1400593111

Teixeira L, Marques RM, Aguas AP, Ferreira PG. *Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits*. Vet Immunol Immunopathol 148 (3-4): 343-7 (2012) doi: 10.1016/j.vetimm.2012.05.006

Thiel HJ, König M. *Caliciviruses: an overview*. Vet Microbiol 69 (1-2): 55-62 (1999)

Thompson J, Clark G. *Rabbit calicivirus disease now established in New Zealand*. Surveillance-Wellington 24: 5–6 (1997)

Tian L, Liao J, Li JW, Zhou WR, Zhang XL, Wang HN. *Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and sequence analysis for the VP60 Gene*. Virus Genes 35 (3): 745-52 (2007)

Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katzea MG. *Into the Eye of the Cytokine Storm*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 76 (1): 16–32 (2012)

Tizard IR. *Introducción a la inmunología veterinaria*. Elsevier (2009)

Torres JM, Ramírez MA, Morales M, Bárcena J, Vázquez B, Espuña E, Pagès-Manté A, Sánchez-Vizcaíno JM. *Safety evaluation of a recombinant myxoma-RHDV virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease*. Vaccine 19 (2-3): 174-82 (2000)

Torres JM, Sánchez C, Ramírez MA, Morales M, Bárcena J, Ferrer J, Espuña E, Pagès-Manté A, Sánchez-Vizcaíno JM. *First field trial of a transmissible recombinant vaccine against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease*. Vaccine 19 (31): 4536-43 (2001)

Trout RC, Chasey D, Sharp G. *Seroepidemiology of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) in the United Kingdom*. Journal of Zoology. 243: 846–853 (1997) doi: 10.1111/j.1469-7998.1997.tb01983.x

Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. *The importance of liver lesions and changes to biochemical and coagulation factors in the pathogenesis of RHD*. Acta Biochim Pol 62 (2): 169-71 (2015) doi: 10.18388/abp.2014_943

Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. *Expression of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- β and GM-CSF in peripheral blood leukocytes of rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus*. Vet Microbiol 186: 71-81 (2016) doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.021

Tung T, Phalen D, Toribio JA. *Adverse reactions in a population of Sydney pet rabbits vaccinated against rabbit calicivirus*. Aust Vet J 93 (11): 405-11 (2015) doi: 10.1111/avj.12373

- Tuñón MJ**, Sanchez-Campos S, Garcia-Ferreras J, Alvarez M, Jorquera F, Gonzalez-Gallego J. *Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure*. J Lab Clin Med 141 (4): 272-8 (2003)
- Tuñón MJ**, San Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Santamaría E, Alvarez M, Prieto J, González-Gallego J. *Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus*. J Pineal Res 50 (1): 38-45 (2011) doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00807
- Tuñón MJ**, San Miguel B, Crespo I, Riezu-Boj JI, Larrea E, Alvarez M, González I, Bustos M, González-Gallego J, Prieto J. *Cardiotrophin-1 promotes a high survival rate in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin*. J Virol 85 (24): 13124-32 (2011) doi: 10.1128/JVI.05725-11
- Ueda K**, Park JH, Ochiai K, Itakura C. *Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease*. Jpn J Vet Res 40 (4): 133-41 (1992)
- Urakova N**, Frese M, Hall RN, Liu J, Matthaei M, Strive T. *Expression and partial characterisation of rabbit haemorrhagic disease virus non-structural proteins*. Virology 484: 69-79 (2015) doi: 10.1016/j.virol.2015.05.004
- Urakova N**, Netzler N, Kelly AG, Frese M, White PA, Strive T. *Purification and Biochemical Characterisation of Rabbit Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases and Identification of Non-Nucleoside Inhibitors*. Viruses 8 (4) (2016) doi:pii: E100. 10.3390/v8040100
- Valíček L**, Smíd B, Rodák L, Kudrna J. *Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. Arch Virol 112 (3-4): 271-5 (1990)
- Valíček L**, Smíd B, Rodák L. *Immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus using monoclonal antibodies*. Acta Virol 36 (6): 589-91 (1992)
- Vallejo D**, Crespo I, San-Miguel B, Alvarez M, Prieto J, Tuñón MJ, González-Gallego J. *Autophagic response in the Rabbit Hemorrhagic Disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure*. Vet Res 45: 15 (2014) doi: 10.1186/1297-9716-45-15
- van de Bildt MW**, van Bolhuis GH, van Zijderveld F, van Riel D, Drees JM, Osterhaus AD, Kuiken T. *Confirmation and phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in free-living rabbits from the Netherlands*. J Wildl Dis 42 (4): 808-12 (2006)
- Vázquez L**, Dacal V, Panadero R. *Principales parasitosis internas de los conejos: medidas de prevención y control*. Boletín de cunicultura 146 (2006)
- Velarde R**, Cavadini P, Neimanis A, Cabezón O, Chiari M, Gaffuri A, Lavín S, Grilli G, Gavier-Widén D, Lavazza A, Capucci L. *Spillover Events of Infection of Brown Hares (Lepus europaeus) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain*. Transboundary and Emerging Diseases (2017) doi:10.1111/tbed.12562
- Vende P**, Le Gall G, Rasschaert D. *An alternative method for direct sequencing of PCR products, for epidemiological studies performed by nucleic sequence comparison. Application to rabbit haemorrhagic disease virus*. Vet Res 26 (3): 174-9 (1995)

Viaplana E, Plana J, Villaverde A. *Antigenicity of VP60 structural protein of rabbit haemorrhagic disease virus*. Arch Virol 142 (9): 1843-8 (1997)

Villafuerte, R, Calvete, C, Gortázar, C, Moreno, S. *First epizootic of rabbit haemorrhagic disease in free living populations of *Oryctolagus cuniculus* at Doñana National Park, Spain*. J Wildl Dis 30 (2): 176-9 (1994)

Villafuerte R, Delibes-Mateos M. *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. Conejo* (Jul, 2017) (http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/ieet_mami_oryctolagus_cuniculus_tcm7-21983.pdf)

VVAA. *Rabbit calicivirus infection confirmed in Iowa rabbitry*. J Am Vet Med Assoc 216: 1537 (2000)

VVAA. *VMD advice on RHDV-2 vaccines*. Vet Rec 179 (4): 85 (2016) doi: 10.1136/vr.i3988

VVAA. *Vaccines for RHDV-2*. Vet Rec 179 (18): 451 (2016) doi: 0.1136/vr.i5870

VVAA. *Advice on RHDV-2 for practices*. Vet Rec 179 (7): 161 (2016) doi: 10.1136/vr.i4375

Wang X, Qiu L, Hao H, Zhang W, Fu X, Zhang H, He S, Zhang S, Du E, Yang Z. *Adenovirus-based oral vaccine for rabbit hemorrhagic disease*. Vet Immunol Immunopathol 145 (1-2): 277-82 (2012) doi: 10.1016/j.vetimm.2011.11.014

Wang X, Xu F, Liu J, Gao B, Liu Y, Zhai Y, Ma J, Zhang K, Baker TS, Schulten K, Zheng D, Pang H, Sun F. *Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography*. PLoS Pathog 9 (1): e1003132 (2013) doi: 10.1371/journal.ppat.1003132

Wei K, Sun Z, Yan Z, Tan Y, Wang H, Zhu X, Wang X, Sheng P, Zhu R. *Effects of Taishan Pinus massoniana pollen polysaccharide on immune response of rabbit haemorrhagic disease tissue inactivated vaccine and on production performance of Rex rabbits*. Vaccine 29 (14): 2530-6 (2011) doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.068

Westcott DG, Choudhury B. *Rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain*. Vet Rec 176 (3): 74 (2015) doi: 10.1136/vr.102830

White PJ, Norman RA, Trout RC, Gould EA, Hudson PJ. *The emergence of rabbit haemorrhagic disease virus: will a non-pathogenic strain protect the UK?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356 (1411): 1087-95 (2001)

White PJ, Trout RC, Moss SR, Desai A, Armesto M, Forrester NL, Gould EA, Hudson PJ. *Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection*. Epidemiol Infect 132 (3): 555-67 (2004)

WHO. *Guidelines on tularemia*, 2007 (Jul, 2017)

(http://www.who.int/csr/resources/publications/deliberate/WHO_CDS_EPR_2007_7/en/)

Wirblich C, Meyers G, Ohlinger VF, Capucci L, Eskens U, Haas B, Thiel HJ. *European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses*. J Virol 68 (8): 5164-73 (1994)

- Xu** ZJ, Chen WX. *Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review*. Vet Res Commun 13 (3): 205-12 (1989)
- Xu** WY. *Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation*. Rev Sci Tech 10 (2): 393-408 (1991)
- Yang** DK, Kim HH, Nah JJ, Song JY. *Rabbit hemorrhagic disease virus variant recombinant VP60 protein induces protective immunogenicity*. J Microbiol Biotechnol 25 (11): 1960-5 (2015) doi: 10.4014/jmb.1504.04002
- Yuan** D, Qu L, Liu J, Guo D, Jiang Q, Lin H, Si C. *DNA vaccination with a gene encoding VP60 elicited protective immunity against rabbit hemorrhagic disease virus*. Vet Microbiol 164 (1-2): 1-8 (2013) doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.021
- Zheng** T, Lu G, Napier AM, Lockyer SJ. *No virus replication in domestic cats fed with RHDV-infected rabbit livers*. Vet Microbiol 95 (1-2): 61-73 (2003)
- Zheng** DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. *Norovirus classification and proposed strain nomenclature*. Virology 346: 312 – 323 (2006)
- Zheng** X, Wang S, Zhang W, Liu X, Yi Y, Yang S, Xia X, Li Y, Zhang Z. *Development of a VLP-based vaccine in silkworm pupae against rabbit hemorrhagic disease virus*. Int Immunopharmacol 40: 164-169 (2016) doi: 10.1016/j.intimp.2016.08.016
- Zhu** J, Wang B, Miao Q, Tan Y, Li C, Chen Z, Guo H, Liu G. *Viral Genome-Linked Protein (VPg) Is Essential for Translation Initiation of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV)*. PLoS One 10 (11): e0143467 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0143467

XI. ANEXOS